

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2019.

Veronika Radišić

960/BPI

**ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST I
UKUPNI FENOLI EKSTRAKATA
MEDICINSKE GLJIVE *Ganoderma
lucidum***

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST I UKUPNI FENOLI EKSTRAKATA MEDICINSKE GLJIVE *Ganoderma lucidum*

Veronika Radišić, 960/BPI

Sažetak: Gljiva *Ganoderma lucidum* je izvor bioaktivnih sastojaka, kao što su triterpeni, polisaharidi, steroidi, fenolni sastojci i glikoproteini. Polisaharidi, posebice β -glukani, triterpeni i fenoli posjeduju antioksidacijska svojstva. U ovom radu su proučavani udjeli ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost u vodenim i metanolnim ekstraktima micelija i plodišta (bazidiokarpa) gljive *G. lucidum*. Za dokazivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata, korištene su tri temeljne metode određivanja: DPPH, ABTS i FRAP. Metanolni ekstrakt je pokazao maksimalnu sposobnost vezanja DPPH slobodnih radikala ($EC_{50} = 0,29$ mg/mL) i ABTS⁺ ($EC_{50} = 0,58$ mg/mL), dok je u vodenom ekstraktu izmjerena bolja sposobnost vezanja željeznih iona ($EC_{50} = 5$ μ g/mL). Udjel ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet bio je značajno veći u metanolnim ekstraktima ($p < 0,01$). Uočena je pozitivna korelacija između koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti. Rezultatima ovog istraživanja je potvrđeno da i micelij i plodište gljive *G. lucidum* posjeduju osobita antioksidacijska svojstva, te se mogu koristiti kao izvrsni izvor supstancija s antioksidacijskom aktivnošću za terapijsku primjenu.

Ključne riječi: medicinske gljive, *Ganoderma lucidum*, bioaktivni sastojci, vezanje slobodnih radikala, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 44 stranice, 12 slika, 7 tablica, 99 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. *Ksenija Markov*
2. izv. prof. dr. sc. *Sunčica Beluhan*
3. doc. dr. sc. *Andreja Leboš Pavunc*
4. prof. dr. sc. *Jasna Novak* (zamjena)

Datum obrane: 12. prosinca 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biochemical Engineering,

Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLICS OF MEDICINAL MUSHROOM *Ganoderma lucidum* EXTRACTS

Veronika Radišić, 960/BPI

Abstract: Fungi of *Ganoderma lucidum* genus contain bioactive components such as triterpenes, polysaccharides, steroids, phenolic compounds and glycoproteins. Polysaccharides, particularly β -glucans, triterpenes and phenolic compounds have antioxidant properties. In this work, the total phenolic contents and antioxidant activity of water and methanolic extracts of *G. lucidum* in mycelia and mature fruiting body (basidiocarp) were evaluated. Three complementary assays, DPPH, ABTS and FRAP were used to screen the antioxidant capacity of extracts. Both aqueous and methanolic extracts were analyzed for free radical scavenging activity. Methanolic extract showed maximum scavenging activity for DPPH ($EC_{50} = 0.29$ mg/mL) and ABTS⁺ ($EC_{50} = 0.58$ mg/mL), whereas aqueous extract had better scavenging for ferric reducing antioxidant power ($EC_{50} = 5$ μ g/mL). Total phenolic content and total antioxidant capacity were significantly higher in methanolic extract ($p < 0.01$). A positive correlation existed between the phenolic content and antioxidant activity. Results indicated that both mycelia and mature fruiting body of *G. lucidum* possess remarkable antioxidant properties, which can be used as excellent sources of antioxidant compounds for therapeutic application.

Keywords: Medicinal mushrooms, *Ganoderma lucidum*, Bioactive compounds, Free radical scavenging, Antioxidant capacity

Thesis contains: 44 pages, 12 figures, 7 tables, 99 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Sunčica Beluhan, Associate professor

Reviewers:

1. PhD Ksenija Markov, Full professor
2. PhD Sunčica Beluhan, Associate professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD Jasna Novak, Full professor (substitute)

Thesis defended: 12th December, 2019

Sadržaj	stranica
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VRSTE <i>REISHI</i> GLJIVA	3
2.1.1. Crna <i>Reishi</i> gljiva.....	3
2.1.2. Ljubičasta <i>Reishi</i> gljiva	4
2.1.3. Crvena <i>Reishi</i> gljiva	4
2.2. FIZIČKE ZNAČAJKE CRVENIH <i>REISHI</i> GLJIVA.....	5
2.3. KEMIJSKI SASTAV CRVENIH <i>REISHI</i> GLJIVA.....	6
2.3.1. Polisaharidi i peptidoglikani.....	6
2.3.2. Triterpeni.....	7
2.3.3. Ostale bioaktivne komponente prisutne u gljivi <i>G. lucidum</i>	7
2.4. ZDRAVSTVENI UČINCI CRVENIH <i>REISHI</i> GLJIVA	9
2.4.1. Imunostimulacijski učinak	9
2.4.2. Antitumorsko djelovanje	9
2.4.3. Antibakterijsko i antifungalno djelovanje	10
2.4.4. Antivirusno djelovanje	10
2.4.5. Učinci u borbi protiv dijabetesa	11
2.4.6. Prevencija plućnih bolesti	12
2.4.7. Učinci povezani s poremećajima u radu jetre.....	12
2.4.8. Učinci povezani s bolestima srca i krvožilnim sustavom	12
2.4.9. Prevencija bolesti prostate	12
2.4.10. Učinci povezani sa živčanim sustavom	13
2.4.11. Antioksidacijsko djelovanje	13
2.4.12. Ostali zdravstveni učinci <i>G. lucidum</i>	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. MATERIJALI I METODE RADA.....	15
3.1.1. Materijali	15
3.1.1.1. Uzorci gljive.....	15
3.1.2. Hranjiva podloga za uzgoj micelija	16
3.1.3. Standardi i reagensi	17
3.1.4. Reagensi za određivanje ukupnih fenola	17
3.2. APARATI.....	18
3.3. METODE ISTRAŽIVANJA	19
3.3.1. Analitičke metode	19
3.3.1.1. Suha tvar gljiva.....	19
3.3.1.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka	19
3.3.1.2.1. Ekstrakcija vrućom vodom	19
3.3.1.2.2. Ekstrakcija metanolom	20
3.3.1.3. Određivanje β -karotena i likopena	20
3.3.1.4. Određivanje askorbinske kiseline	20
3.3.1.5. Određivanje ukupnih fenola.....	21
3.3.1.6. Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta	21
3.3.1.7. Određivanje sposobnosti vezanja slobodnih radikala	21
3.3.1.7.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda	21

3.3.1.7.2. ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] metoda	22
3.3.1.7.3. FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda	22
3.3.1.8. <i>Sposobnost keliranja željeznih iona</i>	23
3.3.1.9. <i>Određivanje reducirajuće snage</i>	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SASTOJAKA	25
4.2. SPOSOBNOSTI VEZANJA SLOBODNIH RADIKALA	30
4.2.1. DPPH i ABTS određivanja	30
4.2.2. FRAP određivanje	31
5. ZAKLJUČCI	33
6. LITERATURA	34

1. UVOD

Reishi je japanski naziv za gljivu *G. lucidum*, dok je u Koreji poznata pod imenom „Young-zhi“. Preko 2000 godina *Reishi* se tradicionalno koristi u kineskoj narodnoj medicini kao učinkoviti lijek protiv raznih bolesti. Radi svoje ljekovitosti, *Reishi* je uživala gotovo božanski status među narodom, što potvrđuje i njeno kinesko ime „Ling-zhi“ koje u prijevodu znači „duhovna moć“.

Danas je poznato da preko 270 vrsta gljiva ima različite pozitivne terapijske učinke, međutim *G. lucidum* je klasificirana kao medicinska gljiva kojoj se pripisuje da ima najviše ljekovitih svojstava od svih gljiva na svijetu. Preparati dobiveni iz *G. lucidum* koriste se za inhibiciju rasta tumora, jačanje imunološkog sustava, poboljšanje pamćenja, snižavanje krvnog tlaka, detoksikaciju, itd. Prema istraživanjima, *Reishi* pokazuje pozitivne zdravstvene učinke zahvaljujući bioaktivnim komponentama koje posjeduje u svom plodištu, miceliju i sporama, poput; polisaharida, triterpenoida, proteina, fenolnih spojeva, vitamina i minerala (Rathee i sur., 2012).

U zadnje vrijeme je u zapadnim zemljama interes za *G. lucidum* porastao intenzivno. Dodaci prehrani koji sadrže ekstrakte *Reishi* veoma su popularni terapijski pripravci širom svijeta. Supstance sadržane u *G. lucidum* mogu potencijalno podržati rad konvencionalne medicine u terapiji protiv različitih bolesti, uključujući i tumore. To zahtjeva daljnje studije koji trebaju dodatno potvrditi njenu učinkovitost i bezopasnost. Očekuje se da će u bližoj budućnosti kliničke studije na ovoj medicinskoj gljivi biti provedene na visokoj razini diljem svijeta.

U ovom su radu određivana antioksidacijska svojstva micelija i plodišta medicinske gljive *G. lucidum*. Pokusi su bili podijeljeni i provedeni u više nezavisnih faza kako bi se:

- 1) odredio prinos ekstrakta iz gljive nakon ekstrakcije s dva ekstrakcijska sredstva; vrućom vodom i metanolom,
- 2) provela ekstrakcija bioaktivnih sastojaka (ukupni fenoli), istražila antioksidacijska svojstva gljiva (udjel askorbinske kiseline, β -karotena i likopena),
- 3) odredio ukupni antioksidacijski kapacitet,
- 4) istražila sposobnost vezanja slobodnih radikala i keliranje željeznih iona,
- 5) odredila reducirajuća snaga i EC_{50} vrijednost u svim određivanjima.

2. TEORIJSKI DIO

Reishi (*G. lucidum*) je od davnina poznata kao ljekovita gljiva, a u drevnoj istočnoj kulturi hvaljena je i kao „lijevakraljeva“. U tradicionalnoj medicini Kine, Japana i Koreje koristi se više od 2000 godina. Prvi puta se spominje u kineskom gljivarskom priručniku „Shen Nong Ben Cao Jing“ kao najljekovitija gljiva koja se koristila za jačanje imunološkog sustava te za liječenje raznih bolesti poput: astme, bronhitisa, hipertenzije, čira na želudcu, nesanicu, kroničnog hepatitisa, itd. (Chang i Buswell, 1999; Zhongui i sur., 2014). *Reishi* je bila iznimno cijenjena među narodom, smatrali su je simbolom blagostanja i dobrog zdravlja, te je bila poznata kao „čarobna gljiva“ i „gljiva sreće“. Također, u narodu se još uvijek koristi kao talisman za kojeg se vjeruje da štiti ljude i domove od zla. Osim što se *G. lucidum* smatra „kraljicom bilja“, u zemljama Azije vjerovalo se da konzumacija *Reishi* gljive može produljiti životni vijek čovjeka, zbog čega je i dobila naziv „gljiva besmrtnosti“ (Wachtel-Galor i sur., 2011).

Zdravstvena vrijednost *G. lucidum* potvrđena je brojnim znanstvenim istraživanjima, kojima je dokazano da *Reishi* sveukupno poboljšava čovjekovo zdravlje. *Reishi* je medicinska gljiva čiji je ljekoviti potencijal prepoznat diljem svijeta. Ima široku primjenu u liječenju različitih bolesti, zbog čega je detaljno proučavana (Moradali i sur., 2007). Od svih terapijskih učinaka, među kojima su antimikrobno, hipoglikemijsko, hepatoprotektivno, imunostimulirajuće i drugo, najveću pažnju znanstvenika *Reishi* ipak privlači zbog antitumorskog djelovanja (Boh i sur., 2007).

Svi liječnici tradicionalne kineske medicine slažu se da je *G. lucidum* najmoćniji od svih poznatih dostupnih adaptogena. Adaptogeni su biljni pripravci koji povećavaju sposobnost tijela da se opire stresu. Uspostavljaju ravnotežu cjelokupnog metabolizma čovjeka, te djeluju pozitivno protiv različitih stresnih stanja u organizmu i to na najbrži mogući način (Richter i sur., 2015). Zbog svega navedenog, status *Reishi* gljive u industriji zdrave hrane je neupitan. Ona je spoj znanja i mudrosti zapadne i istočne kulture. Njena vrijednost kao zdrave namirnice i ljekovitog terapeutika intenzivno se istražuje već preko 40 godina, te se sa sigurnošću može reći da *Reishi* nema nikakvih nuspojava (Matsomoto, 1979).

Zbog toga što se rijetko može naći u prirodi, za običnog čovjeka *Reishi* je bila teško dostupna i jako skupa. Samo su Azijsko plemstvo i bogati pojedinci mogli si je priuštiti. Međutim, to se krajem 20. stoljeća promijenilo, kad je kontinuirana kultivacija *Reishi* gljive u Japanu

omogućila njenu dostupnost svim ljudima diljem svijeta. Nadalje, u 21. stoljeću zahvaljujući biotehnologiji, postalo je moguće razviti *G. lucidum* u laboratoriju u kontroliranim uvjetima te tako u potpunosti riješiti problem njene nedostupnosti (Richter i sur., 2015).

G. lucidum možemo naći u obliku kapsula, praha, čaja ili tinkture. Pripravci se uglavnom koriste za jačanje imunološkog sustava. Visoko su vrijedni ne samo u kineskoj medicini, nego i u konvencionalnoj. Danas je u zemljama Azije *G. lucidum* dopuštena u terapiji liječenja različitih bolesti poput karcinoma, gdje se preporučuje uzimanje *Reishi* tijekom kemoterapije i zračenja, pri čemu olakšava pacijentu njihovo podnošenje i sprječava njihove nuspojave. Također, olakšava podnošenje kirurških zahvata i ubrzava oporavak (Wasser, 2010).

2.1. VRSTE *REISHI* GLJIVA

Ganoderma lucidum gljiva je stapčarka koja prema taksonomiji pripada razredu *Basidiomycetes*. Iako je poznato preko 2000 vrsta *Reishi* gljiva, samo 6 njih su proučavane kako bi se otkrio njihov medicinski potencijal, a to su: crvena, crna, plava, bijela, žuta i ljubičasta *Reishi*. Od svih navedenih vrsta *Reishi* gljiva, crna i crvena su pokazale značajne ljekovite učinke te obe vrste imaju široku upotrebu diljem svijeta u obliku dodataka prehrani.

Tablica 1. Vrste *Reishi* gljiva (Komoda i sur., 1989)

Boja	Okus	Namjena
Plava	Kiselo	Poboljšava vid i funkcije jetre
Crvena	Gorko	Liječenje unutarnjih organa i poboljšanje pamćenja
Žuta	Slatko	Jača funkciju slezene
Bijela	Ljuto	Poboljšava funkcije jetre
Crna	Slano	Poboljšava funkcije pluća
Ljubičasta	Slatko	Poboljšava funkcije očnih zglobova

2.1.1. Crna *Reishi* gljiva

Crna *Reishi* gljiva (*Ganoderma sinensis*) nepravilno je oblikovana te joj klobuk može doseći promjer do 25 centimetara, iako zrele jedinice crne *Reishi* imaju promjer do 15 centimetara. Većina *Reishi* preparata za koje se kaže da sadrže „divlji“ *Reishi* zapravo su crne *Reishi* gljive.

Biljni tonik crne *Reishi* gljive ima mnogobrojna ljekovita svojstva, međutim manje se koristi od crvene *Reishi*, jer ima manji udio polisaharida u svome sastavu (Carlson, 1996).

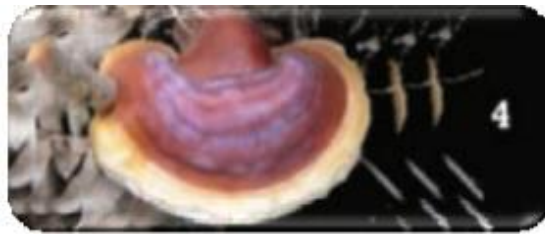
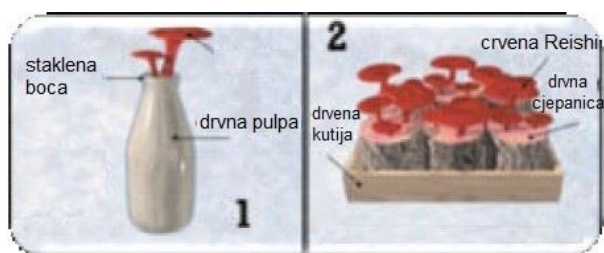
2.1.2. Ljubičasta *Reishi* gljiva

Ljubičasta *Reishi* gljiva se jako rijetko može naći u prirodi te je sličnog izgleda kao i crvena *Reishi*, osim što ima izrazito ljubičasto obojenje u sredini klobuka. Zbog toga što se jedinke autentične ljubičaste *Reishi* gljive rijetko pronalaze u prirodi, istraživanja se ne provode često na toj vrsti *Reishi* gljive (Carlson, 1996).

2.1.3. Crvena *Reishi* gljiva

Postoje kvalitativne i kvantitativne razlike u kemijskom sastavu *G. lucidum* ovisno o soju, podrijetlu gljive, uvjetima kultivacije i načinu ekstrakcije (Wasser i Weis, 1999).

Temperatura je najvažniji faktor za uzgoj micelija crvene *Reishi* gljive. *G. lucidum* može rasti na temperaturi od 30-34 °C, ali optimalna temperatura za njen razvoj micelija je 37 °C. Zabilježeno je da *G. lucidum* na toj temperaturi raste brzinom 7-8 mm/dan (Gao i sur., 2002). Za komercijalnu proizvodnju *Reishi* gljiva koriste se panjevi, piljevina, drvena cjepanica i uzgoj u bocama (Stamens, 2000).

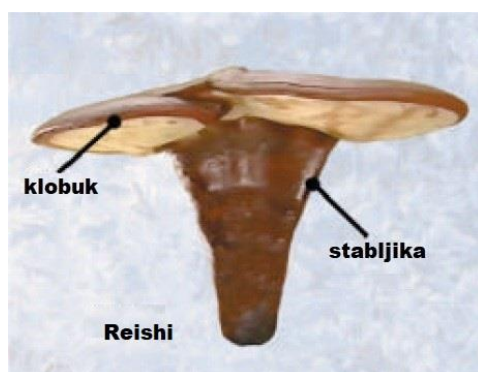


Slika 1. Kultivacija *Reishi* gljive na različitim supstratima: -1. drvena pulpa, -2. drvene cjepanice, -3. panj, -4. piljevina.

2.2. FIZIČKE ZNAČAJKE CRVENIH *REISHI* GLJIVA

Tijelo crvene *Reishi* gljive sastavljeno je od: klobuka u obliku bubrega, stabljike i spora. Raste u području subtropske i umjerene klime, u šumama Azije, SAD-a, Europe i Južne Amerike, gdje preživljava kao saprofit ili fakultativni parazit (Stamens, 2000). U zemljama dalekog istoka, najčešće se može pronaći na stablima japanske šljive *Prunus salicina*, dok se u Europi *G. lucidum* može naći ljeti i u jesen na različitim vrstama listopadnog drveća poput; hrasta, javora ili brijesta (Sokol, 2000).

Stabljika gljive povlači nutrijente iz drveta na kojem je nastanjena. U prirodi, gljive uglavnom rastu na suhim trupcima uvele šljive, hrasta (*Quercus serrata*) ili noćurka (*Pasonia brunoniana*), dok je crvena *Reishi* u Japanu uglavnom kultivirana presađivanjem gljivica na stari japanski hrast. Kao što poslovice kaže „ono smo što jedemo“, kvaliteta crvene *Reishi* gljive uvelike ovisi o hranjivim tvarima prisutnim u njenom staništu. Količina dostupnih nutrijenata određuje veličinu klobuka gljive. Kako *Reishi* sazrijeva, stvaraju se spore i otpuštaju u zrak. Zbog iznimno tvrde vanjske ljuske spora, teško dolazi do klijanja, zbog čega se u prirodi rijetko mogu naći u potpunosti zrele crvene *Reishi* gljive (Hobbs, 1995).



Slika 2. Plod *Reishi* gljive (Hobbs, 1995)

Plod crvene *Reishi* gljive tvrd je i kožast, grbave i sjajne površine. Klobuk je okrugao ili u obliku bubrega, promjera od 30-250 mm. Klobuci su u mladosti žute boje, no s vremenom postepeno poprimaju crvenu, crvenoljubičastu, crvenosmeđu ili crvenocrnu boju. Na klobuku su izraženi koncentrični krugovi koji se prelijevaju od tamnocrvene boje u sredini sve do potpuno bijele boje na rubu, koji je nepravilan i valovit. Stabljika je vijugava i nepravilna. Ima promjer od 10-20 mm i dužinu do 120 mm, iste je boje kao i klobuk ili tamnije. Spore *Reishi*

gljive su elipsoidne ili ovalne, sastavljene od dva površinska sloja: vanjskog; bezbojnog i glatkog, te unutarnjeg; žuto-smeđeg, grudastog, veličine od 6-11 μm (Hagara, 1999).

2.3. KEMIJSKI SASTAV CRVENIH *REISHI* GLJIVA

Voda čini 90% sastava gljive *G. lucidum*. Preostalih 10% čine: 10-40% proteini, 2-8% masti, 3-28% ugljikohidrati, 3-32% vlakna, 8-10% pepeo, vitamini i minerali bogati kalijem, željezom, kalcijem, magnezijem, cinkom, selenijem, fosforom i bakrom (Zhou i sur., 2007). *G. lucidum* predstavlja vrijedan izvor prirodnih bioloških aktivnih komponenta poput: polisaharida, triterpenoida, fenola, nukleotida i njihovih derivata, sterola i glikoproteina. Proteini nađeni u gljivi *G. lucidum* sadrže sve esencijalne aminokiseline, a posebno su bogati lizinom i leucinom. Polisaharidi, peptidoglikani i triterpeni tri su najvažnije bioaktivne supstance prisutne u gljivi *G. lucidum* (Moncalvo i Ryvarden, 1997; Zhao i sur., 2012). Polisaharidi *G. lucidum* smatraju se glavnom skupinom aktivnih supstanci koje najviše doprinose njenoj pozitivnoj zdravstvenoj vrijednosti.

2.3.1. Polisaharidi i peptidoglikani

Polisaharidi pronađeni u *Reishi* prisutni su u 10-50% suhe tvari tijela gljive (Skalicka-Wozniack i sur., 2012). Preko 200 različitih polisaharida izolirano je iz tijela, spora, micelija ili tekuće kulture gljive *Reishi* (Wasser, 2010). To su: β -D-glukani, α -D-glukani, α -D-manani, te različiti proteoglikani. Biološka aktivnost glukana ovisi o njihovoj topljivosti u vodi, molekulskoj masi, grananju i obliku molekule. Učinkovitost β -glukana također ovisi o broju i dužini bočnih lanaca te načinu vezanja s glavnim lancem (β -1,3, β -1,4 ili β -1,6-glikozidna veza) (Wasser, 2011). Ispitivanja su dokazala da se polisaharidi *G. lucidum* većinom sastoje od glukoze, galaktoze, manoze, fukoze, ksiloze i arabinoze, od kojih je glukoza najzastupljenija. Polisaharidi imaju širok spektar bioaktivnog djelovanja, među kojima je dokazan njihov imunostimulirajući, protuupalni, antitumorski i antioksidacijski učinak (Chen i sur., 2009; Xu i sur., 2011; Kao i sur., 2013).

Istraživanja su utvrdila da polisaharidi iz *Reishi* pokazuju iznimnu učinkovitost u liječenju oštećenja izazvanih gama zračenjem (Pillai i sur., 2008). Osim toga, α -D-glukani nađeni u staničnoj stijenci *Reishi* gljive pokazuju citotoksičnu aktivnost prema HeLa stanicama raka

(Wiater i sur., 2012). Također, dokazano je da polisaharidi izolirani iz *Reishi* djeluju kao prebiotici koji stimuliraju rast probiotika roda *Bifidobacterium* (Yamin i sur., 2012).

Značajna uloga u pozitivnom zdravstvenom djelovanju *Reishi* gljive može se pripisati kompleksima proteina i polisaharida. Naime, *Reishi* je izvor ganoderana, peptidoglukana koji ima antitumorsko djelovanje i koji sadrži β -1,3-glukane i 4% proteina (Ooi i Liu, 2000).

2.3.2. Triterpeni

Terpeni su hlapivi nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa, široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Triterpeni su podskupina terpena, sastavljena od 6 izoprenskih jedinica, a triterpenoidi su derivati triterpena koji sadrže kisik. Triterpenoidi pronađeni u *Reishi*, koji sadrže karboksilnu grupu, generalno se zovu ganodermne kiseline. Imaju kompleksnu strukturu, lipofilne su molekule te im je molekularna masa u rasponu od 450 do 650 kDa. Po kemijskoj strukturi, triterpenoidi su visoko oksidirani derivati lanostana (Ma i Chen, 2003).

Preko 150 derivata ganodermnih kiselina i drugih triterpenoida izolirano je iz *G. lucidum* i drugih gljiva roda *Ganoderma* (Russel i Paterson, 2006). Oni uključuju ergosterol i njegove derivate, kao i derivate lanostana, poput ganodermnih kiselina (A, AM1, B, C1, C2, D, DM, F, G, H, K, Me, Mk, S, T, TR, Y), ganoderenične kiseline (A, B, D), ganoderole (A, B), ganoderiol F, ganodermatriol, ganoderol A, ganoderol G te lucideričnu kiselinu A (Liu i sur., 2012).

Prema rezultatima znanstvenih istraživanja, triterpeni pokazuju sljedeće učinke: smanjenje krvnog tlaka, smanjenje razine kolesterola u krvi, djeluju hepatoprotektivno, inhibiraju angiogenezu i agregaciju trombocita (Liu i sur., 2007). Ganodermne kiseline također pokazuju protuupalno i antikancerogeno djelovanje (Liu i sur., 2009). Triterpeni imaju pozitivne učinke na kognitivne funkcije i pamćenje (Zhang i sur., 2011).

2.3.3. Ostale bioaktivne komponente prisutne u gljivi *G. lucidum*

Proteini s terapijskim djelovanjem također su izolirani iz *G. lucidum*. Micelij ove gljive sadrži Ling-Zhi 8 (LZ-8) protein koji pokazuje imunostimulativni učinak i potiče mitotičku aktivnost stanica (Lin i sur., 1997), dok protein ganodermin, izoliran iz tijela *Reishi*, pokazuje antifungalno djelovanje (Wang i Ng, 2006). *Reishi* također sadrži nukleozide poput adenzina, cistidina, gvanozina, inozina, timidina i različite nukleotide (Gao i sur., 2007).

Tijelo i micelij *Reishi* gljive sadrže sterole, poput ergosterola (provitamin D2), te ergosterol peroksid, koji inhibiraju rast stanica karcinoma dojke (Zheng i sur., 2009). Od svih minerala koji su sadržani u tijelu *Reishi*, germanij i selenij su najvažniji jer pojačavaju antitumorsko djelovanje. Medicinsko djelovanje *G. lucidum* prikazano je Tablici 2.

Tablica 2. Medicinski učinci gljive *G. lucidum*

Bioaktivni sastojci	Djelovanje	Liječenje
Polisaharidi	Imunostimulacijsko	Tumori
	Antitumorsko	Leukemija, rak dojke
	Antivirusno	Hepatitis B
	Snižavanje razine kolesterola i triglicerida	Hiperlipidemija
	Antioksidacijsko	Starenje
	Hipoglikemijsko	Dijabetes
Triterpenoidi	Sprječavanje agregacije trombocita	Tromboza, krvožilne bolesti, moždani udar
	Citotoksično	Tumor dojke i prostate
	Hepatoprotektivno	Kronični hepatitis B, oštećenja jetre
	Antihistaminsko	Alergije
	Smanjenje krvnog tlaka	Hipertenzija
	Antivirusno	HIV i Epstein-Barr virusna infekcija
	Protuupalno	Upalne bolesti
	Poboljšava pamćenje	Demencija
LZ-8 protein	Imunostimulativno	Tumori
Adenozin	Sprječavanje agregacije trombocita	Bolesti krvožilnog sustava
Steroli	Antitumorsko	Tumor dojke

2.4. ZDRAVSTVENI UČINCI CRVENIH *REISHI* GLJIVA

Zapisi o zdravstvenim učincima ove gljive mogu se pronaći u kineskoj drevnoj knjizi „Compendium of Materia Medica“ iz 16. stoljeća, nastaloj za vrijeme vladavine dinastije Ming. Danas je *Reishi* najpoznatija medicinska gljiva na svijetu. Osim što se spominje u farmakopeji Narodne Republike Kine, zapisana je i u američkoj farmakopeji kao učinkoviti dodatak prehrani. *Reishi* je dozvoljena za liječenje vrtoglavice, nesanice, tremora, kašlja i astme. U zadnjim desetljećima, u brojnim *in vitro* i istraživanjima na životinjama, potvrđeno je da *G. lucidum* ima mnogobrojne pozitivne zdravstvene učinke. Najvažniji učinci *Reishi* gljive su: imunostimulacijsko, antitumorsko, protuupalno, antibakterijsko, antivirusno, antidijabetičko, pomlađujuće te hepatoprotektivno djelovanje (Boh i sur., 2007). *Reishi* također ima pozitivni učinak na krvožilni sustav te uspješno liječi čir na želudcu (Wasser, 2005).

2.4.1. Imunostimulacijski učinak

G. lucidum sadrži β -D-glukane, Zhi-8 proteine i triterpenoide koji imaju imunostimulacijsko djelovanje. Njihov učinak temelji se na stimulaciji stanica imuno sustava poput: makrofaga, prirodnoubilačkih (NK) stanica i T limfocita, koji su ključni u obrani organizma od virusnih infekcija i tumora. *In vitro* testovi pokazali su da vođeni ekstrakti iz *G. lucidum* stimuliraju proizvodnju citokina poput interleukina IL-2, IL-10, IL-1 β , IL-6, faktora nekroze tumora (TNF- α) i interferona (Sanodiya i sur., 2009). Dokazano je da ekstrakti iz spora *Reishi* utječu na porast broja makrofaga i prirodnoubilačkih (NK) stanica u miševa, te inhibiraju razvoj tumora (Song i sur., 2010). Također, supstance iz gljive *Reishi* inhibiraju alergijske reakcije zahvaljujući njihovom učinku na mastocyte i B limfocite (Calder, 2003).

2.4.2. Antitumorsko djelovanje

Veliki broj studija potvrdio je da korištenje ekstrakta *G. lucidum* u liječenju tumora dovodi do inhibicije rasta K562 stanica leukemije, MCF-7 stanica karcinoma dojke i karcinoma ovarija (Zhong i sur., 1999; Zheng i sur., 2009; Qu i sur., 2011). U istraživanjima provedenim na životinjama, do smanjenja tumora došlo je zbog uništavanja krvnih žila što je rezultiralo smanjenom opskrbom krvi tumorskih stanica te nekrozom, izazvanom djelovanjem T limfocita

i lokalno proizvedenih TNF- α . Dokazano je da LZ-8 protein iz *Reishi* inhibira proliferaciju i inducira apoptozu HL60 humanih stanica leukemije (Nie i sur., 2010).

Također, u nedavnim istraživanjima potvrđeno je da vodeni i alkoholni ekstrakti *G. lucidum* te ulje njenih spora inhibicijski djeluju na enzime topoizomerazu I i topoizomerazu II koje imaju ključnu ulogu u nastanku tumora (Chen i sur., 2016). Od svih bioaktivnih komponenata sadržanih u *G. lucidum*, polisaharid β -D-glukan, ima najsnažnija antitumorska svojstva. On djeluje na način da aktivira makrofage, koji su važna imunološka obrana od mikrobnih uzročnika bolesti poput virusa i bakterija (Gao i sur., 2003).

Za razliku od konvencionalnih antitumornih lijekova, bioaktivne komponente *G. lucidum* djeluju na način da stimuliraju različite imunološke odgovore u domaćinu, a da pri tom ne uzrokuju nikakva sustavna oštećenja organizma (Zhang i sur., 2007).

2.4.3. Antibakterijsko i antifungalno djelovanje

U velikom broju različitih studija dokazano je antibakterijsko djelovanje *G. lucidum*. Bioaktivne komponente sadržane u *Reishi* gljivi inhibiraju rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Gao i sur., 2003). Ekstrakt iz *Reishi* inhibira rast *Helicobacter pylori*, bakterije odgovorne za stvaranje čira na želudcu i raka želuca. Štoviše, ekstrakt pokazuje veću aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* nego antibiotici ampicilin i streptomycin (Suay i sur., 2000; Heleno i sur., 2013). Također, dokazano je antifungalno djelovanje ekstrakta *Reishi*. Ganodermin sadržan u miceliju *G. lucidum* inhibira micelijski rast *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Phytophthora blight* (Zhang i sur., 2011). Metanolni ekstrakt *G. lucidum* ima antimikrobno djelovanje na bakterije *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Shah i sur., 2014).

2.4.4. Antivirusno djelovanje

Različiti ekstrakti *G. lucidum* pokazuju antivirusno djelovanje. Polisaharidi direktno djeluju na hepatitis B virus inhibicijom DNA polimeraze, dok ganodermediol pokazuje aktivnost protiv herpes simplex virusa tipa 1 (Babitskaya i sur., 2003).

Ganodermane kiseline izolirane iz *Reishi* antivirusno djeluju protiv Epstein-Barr i HIV-virusa (Eo i sur., 2000). HIV je virus humane imunodeficijencije koji uzrokuje opasnu infekciju koja

pogađa više od 35 milijuna ljudi širom svijeta (Paydary i sur., 2013). To je retrovirus koji uzrokuje AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije. AIDS je smrtonosna, neizlječiva bolest, do koje dolazi tako što HIV virus postupno uništava imunološki sustav čovjeka. Trenutna strategija u borbi protiv HIV-a uključuje odlaganje njegove progresije i sprječavanje razvitka infekcije u AIDS, što u centar ispitivanja dovodi enzime reverznu transkriptazu i proteazu. Reverzna transkriptaza provodi konverziju virusne RNA u DNA koja se potom integrira u genom domaćina. S druge strane, ekspresijom određenih gena stvaraju se poliproteini koje HIV proteaza prevodi u potpuno funkcionalne virusne proteine (Scanlon i Vreeman, 2013). U provedenim istraživanjima dokazano je da bioaktivne komponente *G. lucidum* pokazuju inhibitorno djelovanje na HIV virus. Točnije, triterpenoidi *G. lucidum* pokazali su anti-HIV-1 učinak, koji se uglavnom odnosi na inhibiciju HIV-1 proteaze (El-Mekkawy i sur., 1998). Također, *G. lucidum* posjeduje enzim lakazu koja može dovesti do inhibicije HIV-1 reverzne transkriptaze (Bishop i sur., 2015).

2.4.5. Učinci u borbi protiv dijabetesa

Šećerna bolest ili dijabetes je poremećaj metabolizma kojeg karakterizira povećana razina glukoze u krvi, do koje dolazi jer gušterača ne proizvodi inzulin ili je učinak proizvedenog inzulina smanjen. Postoje dvije vrste dijabetesa: dijabetes tipa I i dijabetes tipa II. Kod dijabetesa tipa I gušterača uopće ne proizvodi inzulin jer su joj uništene beta stanice koje ga stvaraju, a kod dijabetesa tipa II gušterača proizvodi inzulin, ali ne u dovoljnim količinama. Istraživanja na životinjama su pokazala da frakcija polisaharida iz *G. lucidum* (ganoderan B i ganderan D) ima hipoglikemijski potencijal. Također, studije su dokazale da je ekstrakt iz *Reishi* učinkovit u snižavanju razine glukoze u krvi kod pacijenata koji boluju od dijabetesa tipa II, te se njegov učinak može usporediti s učinkom koje daju oralni antidijabetički lijekovi i inzulin (Gao i sur., 2004). Problemi s ranama kod osoba koje boluju od dijabetesa vrlo su česti, te nerijetko mogu dovesti do amputacije ekstremiteta. Prema istraživanju, zarastanje rana kod pacijenata koji su koristili polisaharide *G. lucidum* bilo je brže za preko 20% (Seto i sur., 2009). Triterpenoidi *G. lucidum* imaju inhibicijski učinak na enzim aldehid reduktazu i α -glukozidazu. Aldehid reduktaza provodi konverziju glukoze u sorbitol, a nakupljanje sorbitola može uzrokovati pojavu retinopatije, nefropatije, neuropatije i katarakte. Ganoderol B iz *G. lucidum* ima snažan inhibicijski učinak na α -reduktazu koja svojom aktivnošću dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi (Feldhammer i sur., 2013).

2.4.6. Prevencija plućnih bolesti

Utvrđeno je da korištenje crvene *Reishi* pokazuje pozitivne zdravstvene učinke kod osoba oboljelih od kroničnog bronhitisa, astme i alergija. Preparati crvene *Reishi* učinkoviti su u suzbijanju kašlja i kao sredstvo protiv iskašljavanja koje ubrzava izlučivanje sekreta. Smatra se da crvena *Reishi* potiče regeneraciju dušnika i epitela dišnih puteva, što je iznmno bitno kod pacijenata koji su potrošači duhanskih proizvoda i koji boluju od kroničnog bronhitisa.

2.4.7. Učinci povezani s poremećajima u radu jetre

Jetra je najveća žlijezda u ljudskom organizmu i predstavlja jedini organ koji se može regenerirati. Ima ključnu ulogu u metaboliziranju hrane te u procesu detoksifikacije otrova i lijekova. Ekstrakti *G. lucidum* dokazano pomažu kod pacijenata s oštećenjima jetre. Naime, kod pacijenata s kroničnim hepatitisom B, preparat *G. lucidum* koji sadrži polisaharide normalizirao je razinu aminotransferaze, čije povišene vrijednosti uzrokuju kritično stanje (Zhou i sur., 2002). Ekstrakt gljive *Reishi* koji sadrži triterpenoide pokazao je hepatoprotektivni učinak na miševima, zahvaljujući pojačanoj sposobnosti da ukloni slobodne radikale iz jetre (Wang i sur., 2002).

2.4.8. Učinci povezani s bolestima srca i krvožilnim sustavom

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrti i invaliditeta širom svijeta. Većinom su uzrokovane aterosklerozom, odnosno promjenama, oštećenjima i naslagama na stijenci arterija, koje mogu uzrokovati nastajanje tromboze, embolije i dr. Crvena *Reishi* pokazuje mnogobrojne pozitivne učinke kod kardiovaskularnih oboljenja poput: snižavanje krvnog tlaka, snižavanje razine LDL-kolesterola te poboljšanu cirkulaciju krvi. U kliničkim istraživanjima koja uključuju pacijente s primarnom fazom hipertenzije, stabilizacija krvnog tlaka bila je uočena već 2 mjeseca nakon konzumacije ekstrakta crvene *Reishi* gljive (Jin i sur., 1996).

2.4.9. Prevencija bolesti prostate

Problemi s donjim urinarnim traktom kod muškaraca obično su povezani s benignom hiperplazmijom prostate. Vrlo je česta kod muškaraca starije životne dobi, pri čemu dolazi do povećanja prostate, koja može dovesti do smanjenog protoka urina i učestalog mokrenja. Uz navedene probleme, nerijetko dolazi do pojave raka prostate. Prema istraživanju, kod muškaraca s blagim do umjerenim problemima u donjem urinarnom traktu, etanolni ekstrakt *G. lucidum* pokazao se vrlo učinkovitim i sigurnim u liječenju. Naime, ekstrakt *Reishi* gljive inhibira 5- α -reduktazu, enzim koji je prisutan u velikim količinama u prostati kod benigne hiperplazije (Zhong i sur., 2015). Enzim 5- α -reduktaza sudjeluje u konverziji testosterona u dihidrotestosteron, koji pospješuje rast stanica raka prostate, stimulirajući androgene receptore (Liu i sur., 2007).

2.4.10. Učinci povezani sa živčanim sustavom

Prednosti primjene crvene *Reishi* uočene su kod osoba koje boluju od Alzheimerove bolesti (Yoon i sur., 1994). Pretpostavlja se da neurozaštitni učinak *G. lucidum* potječe od stimuliranja neurogeneze i usporavanja starenja živčanih stanica (Seow i sur., 2013). Također, istraživanjima je potvrđeno da ekstrakt *G. lucidum* smanjuje simptome kod osoba koje boluju od neuroastenije (Tang i sur., 2005). Neuroastenija je bolest koju karakterizira rastrojenost živčanog sustava zbog njegove iscrpljenosti ili pretrpljenih teških bolesti. Obilježavaju je kronični duševni i tjelesni umor, slabost, razdražljivost i nesanica.

2.4.11. Antioksidacijsko djelovanje

Oksidativni stres je stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja izuzetno reaktivnih, slobodnih kisikovih čestica. Reaktivne kisikove čestice (slobodni radikali) sadrže slobodni nespareni elektron koji može oštetiti DNA, proteine i lipide stanične membrane što u konačnici narušava zdravlje čovjeka i dovodi do pojave različitih bolesti. Kako bi se smanjio učinak oksidativnog stresa u organizmu, danas se koristi veliki broj preparata s antioksidativnim djelovanjem. Među njima se većinom nalaze sintetički antioksidansi, koji mogu dovesti do oštećenja jetre (Yuan i sur., 2008). Nasuprot tome, prirodni antioksidansi iz *G. lucidum* brzo se apsorbiraju, nisu toksični i mogu neutralizirati štetne slobodne radikale (Wachtel-Galor i sur., 2004). Antioksidativna svojstva *G. lucidum* pripisuju se polifenolnim komponentama, polisaharidima, proteoglikanima, terpenima i mikroelementima (Smina i sur., 2011).

2.4.12. Ostali zdravstveni učinci *G. lucidum*

Depresija i anksioznost, moderne su bolesti današnjice koje zahvaćaju sve veći dio populacije. Istraživanja provedena na životinjama ukazala su da crvena *Reishi* gljiva djeluje kao antidepresiv i anksiolitik, te prema učinku može konkurirati pravim lijekovima (Ali i sur., 2016; Muhammad i Ali, 2017). Također, pretilost je sve veći problem današnjice, ali *Reishi* i u ovom području pokazuje obećavajuća svojstva. Naime, ekstrakt *G. lucidum*, prema istraživanjima provedenim na miševima, pokazuje pozitivne učinke pri čemu dolazi do smanjenja tjelesne mase miševa (Chang i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE RADA

3.1.1. Materijali

3.1.1.1. Uzorci gljive

Uzorci gljive *G. lucidum* (Hrastova sjajnica) nabavljeni su iz Fungi perfecti d.o.o. u Zagrebu u travnju 2019. godine. Svježi uzorci su odmah izvagani, te im je izmjeren promjer i dužina (Slika 3). Uzorci su izrezani skalpelom i stavljeni na sušenje 6 h pri 50 °C. Nakon sušenja, usitnjeni su i pripremljeni za ekstrakciju (Slika 4).



Slika 3. Fotografija plodišta istraživane crvene gljive *G. lucidum* (fotografirala Veronika Radišić)



Slika 4. Fotografija usitnjenog plodišta istraživane crvene gljive *G. lucidum* (fotografirala Veronika Radišić)

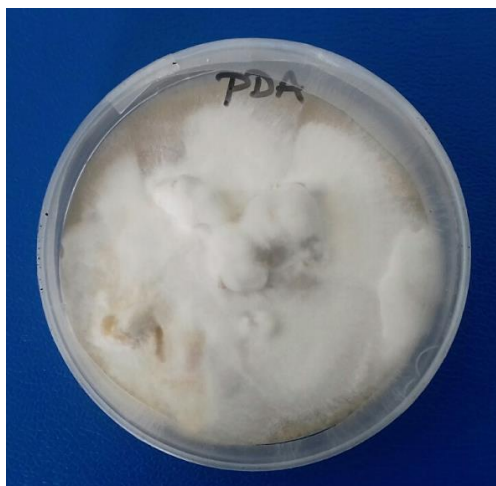
3.1.2. Hranjiva podloga za uzgoj micelija

Nabavljeni micelij gljive *G. lucidum* bio je nacijepljen na zrna pšenice koja su naknadno nacijepljena na PDA podlogu (eng. Potato Dekstroze Agar) slijedećeg sastava:

Tablica 3. Sastav PDA podloge

Sastojci	Koncentracija g/L
krumpir	250
dekstroza	18
agar-agar	20

Podloga je sterilizirana pri 121 °C, nakon čega je pH podešen na 5,5 – 6,0.



Slika 5. Fotografija uzgojenog micelija istraživane crvene gljive *G. lucidum* na PDA hranjivoj podlozi (fotografirala Veronika Radišić)

3.1.3. Standardi i reagensi

Kalijev dihidrogen fosfat, dikalijev hidrogen fosfat, kalijev ferocijanid, željezni klorid, klorovodična kiselina, trikloroctena kiselina, octena kiselina, pirogallol i Folin-Ciocalteu reagens nabavljeni su od Mercka (Darmstadt, Njemačka). Galna kiselina, metafosforna kiselina, (+)-katehin, 2,6-diklifenolindofenol, L-askorbinska kiselina, β -karoten, acetonitril, α -tokoferol, 2,2-difenil-1-pikrilhidranil radikal (DPPH), EDTA su nabavljeni od Sigme (SAD). Metanol, dikormetan, aceton, *n*-heksan, etil acetat, etanol, petroleter su bili proizvodi Kemike (Zagreb, Hrvatska).

3.1.4. Reagensi za određivanje ukupnih fenola

1. otapalo: destilirana voda, H_2O
2. Folin-Ciocalteu reagens
3. zasićena otopina natrijeva karbonata, Na_2CO_3

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopljeno je u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohlađeno na sobnu temperaturu. Dodano je nekoliko kristalića natrijeva karbonata, te u odmjerne tikvici od 1000 mL nadopunjeno destiliranom vodom i nakon 24 sata filtrirano.

4. galna kiselina (0,03 g galne kiseline je otopljeno u etanolu u odmjerne tikvici od 100 mL).

3.2. APARATI

- pH-metar

Pri radu je korišten ručni pH-metar "Hanna Instruments", model HI98103, SAD.

- Vage

Analitička vaga "Mettler", Švicarska

Digitalna analitička vaga "Shimadzu", Japan

Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g, Slovenija

- Sušionik

Za određivanje suhe tvari biomase i ekstrakata korišten je sušionik "Instrumentaria" ST-05, 50-200 °C, Hrvatska.

- Vibro mikser

Za homogenizaciju uzoraka korišten je vibrirajući mikser "Tehtnica EV-102", Železniki, Slovenija.

- Spektrofotometar

Za mjerenje apsorbancije korišten je spektrofotometar Unicam Helios ε, SAD.

3.3. METODE ISTRAŽIVANJA

3.3.1. Analitičke metode

3.3.1.1. Suha tvar gljiva

Suha tvar gljiva određivana je sušenjem gljiva do konstantne mase pri 105 °C/24 h. Nakon hlađenja u eksikatoru, uzorci su izvagani, te je izračunata suha tvar u svakom uzorku (Alvarez i Enriquez, 1988).

Udjel suhe tvari, izražen u postotcima računat je prema jednadžbi:

$$w \text{ (s. tv. \%)} = [100 - (m_2 - m_3) / (m_2 - m_1)] \times 100 \quad [1]$$

w - maseni udjel suhe tvari u uzorku (%)

m₁ - masa prazne posude (g)

m₂ - masa posude i uzorka prije sušenja (g)

m₃ - masa posude i osušenog uzorka (g)

3.3.1.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka iz plodišta i micelija suhe *G. lucidum* provedena je s dva ekstrakcijska sredstva: vodom pri 95 °C (10 minuta) uz povratno hladilo i metanolom (180 min) pri 37 °C na magnetnoj mješalici (Tsai i sur., 2007).

3.3.1.2.1. Ekstrakcija vrućom vodom

3 g osušene gljive odvagano je s točnošću ±0,1 g i homogenizirano s 40 mL zagrijane destilirane vode (50 °C). Homogena smjesa ekstrahirana je 10 minuta pri temperaturi oko 90-95 °C uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt je filtriran kroz filter papir, a zaostali talog ponovno je ekstrahiran s 20 mL destilirane vode uz povratno hladilo još 10 minuta. Dobiveni ekstrakti su spojeni u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopunjeni vodom do oznake.

3.3.1.2.2. Ekstrakcija metanolom

3 g osušene gljive odvagano je s točnošću $\pm 0,1$ g i homogenizirano s 40 mL metanola (95 %). Homogena smjesa ekstrahirana je 180 minuta pri 37 °C na magnetnoj mješalici (250 okr/min). Dobiveni ekstrakt je filtriran kroz filter papir, a zaostali talog ponovno je ekstrahiran s 40 mL metanola još 60 minuta. Ekstrakti su spojeni u odmjerne tikvice od 100 mL i nadopunjeni vodom do oznake.

3.3.1.3. Određivanje β -karotena i likopena

β -karoten (provitamin A) i likopen su ekstrahirani i određeni prema metodi Barros i sur. (2008). Uzorci suhih gljiva (100 mg) su 1 min miješani na vibrirajućoj mješalici s 10 mL smjese aceton:heksan (4:6) i nakon toga profiltrirani kroz filter papir. Filtratima je izmjerena apsorbanacija na 453, 505 i 663 nm. Koncentracije β -karotena i likopena su izračunate prema jednadžbama:

$$\beta\text{-karoten (mg/100 mL)} = 0.216 \cdot A_{663} - 0.304 \cdot A_{505} + 0.452 \cdot A_{453} \quad [2]$$

$$\text{likopen (mg/100 mL)} = -0.0458 \cdot A_{663} + 0.372 \cdot A_{505} - 0.0806 \cdot A_{453} \quad [3]$$

3.3.1.4. Određivanje askorbinske kiseline

Askorbinska kiselina je određivana spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom (Jagota i Dani, 1982). Ekstrakti (0,5 mL) su dodani u 0,8 mL 10 %-tne trikloroctene kiseline i naglo promiješani. Reakcijska smjesa je ostavljena 5 minuta na ledu i nakon toga centrifugirana pri 3000 okretaja/5 min. Dobiveni ekstrakti (2 mL) su razrijeđeni do 2 mL s destiliranom vodom. Komercijalni pripravak Folin-Ciocalteu reagensa (2,0 M) je razrijeđen 10 puta s destiliranom vodom, nakon čega je po 0,2 mL dodano u ekstrakte i naglo promiješano. Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je mjerena apsorbanacija pri 760 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Koncentracije askorbinske kiseline su određene očitavanjem vrijednosti iz baždarnog dijagrama pripremljenog sa standardom L-askorbinske kiseline.

3.3.1.5. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli su određivani Folin-Ciocalteu metodom (Marinova i sur., 2005). U epruvetu je otpipetirano 1 mL ekstrakta i 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa, nakon čega je smjesa homogenizirana na vibromikseru. Nakon 3 minute je reakcijskoj smjesi dodano 1 mL zasićene otopine Na_2CO_3 (200 mg/mL). Uzorak je ostavljen u mraku na sobnoj temperaturi 15 minuta, nakon čega je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 725 nm (A_{725}) (Barros i sur., 2008). Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta stavljena destilirana voda. Baždarni dijagram je izrađen s galnom kiselinom (0,01-0,4 mM; $R^2 = 0,9999$). Rezultati (mg galne kiseline/g ekstrakta gljive) su izračunati prema jednadžbi: $Y = 2,8557 \cdot X - 0,0021$.

3.3.1.6. Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidansi su, po definiciji, sve one tvari koje u maloj količini i kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidanata. Slobodni radikal je svaki atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim jer su sposobni oksidirati biološke molekule (Tseng i Mau, 2007).

Ukupan antioksidacijski kapacitet ekstrakata je određivan metodom s fosfomolibdatom. Metoda se temelji na redukciji Mo(IV) do Mo(V) ekstrakcijom i naknadnim nastajanjem zelenog fosfat-Mo(V) kompleksa u kiselim uvjetima (pH 5,0). Alikvotu od 1 mL ekstrakta je dodan 1 mL otopine reagensa (0,6 M sumporna kiselina, 28 mM natrijev fosfat i 4 mM amonijev molibdat). Epruvete s reakcijskim smjesama su inkubirane pri 95 °C tijekom 90 minuta. Nakon hlađenja do sobne temperature, apsorbancije uzoraka su mjerene pri 695 nm. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata je bio izražen kao ekvivalent butiliranog hidroksil toluena, BHT/g suhe tvari gljive.

3.3.1.7. Određivanje sposobnosti vezanja slobodnih radikala

3.3.1.7.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je mjerenjem sposobnosti inhibicije slobodnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Antioksidacijska sposobnost se mjeri u vidu

otpuštanja vodika od strane antioksidansa odnosno sposobnosti vezivanja radikala pri čemu se koristi stabilan DPPH radikal (Cheung i sur., 2003).

U kivetu širine 1 cm pipetirano je 2 mL DPPH otopine i izmjerena početna apsorbancija otopine radikala (A_0). U kivetu je potom dodana etanolna otopina (50 μ L) uzorka, reakcijska smjesa je dobro promiješana i ostavljena da stoji 20 minuta na tamnom mjestu (sobna temperatura). Promjena apsorbancije reakcijske smjese mjerena je pri valnoj duljini od 517 nm. Sposobnost vezanja slobodnih radikala uzoraka mjerena je pri različitim razrjeđenjima (1:1; 1:10; 1:50; 1:100) pripremljenim s etanolom. Za baždarenje spektrofotometra i određivanje nule u referentnoj kiveti korišten je čisti (95%) etanol.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računat je prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [1 - (A_{\text{uzorka}} - A_0)] \times 100 \quad [4]$$

A_{uzorka} – apsorbancija istraživanog uzorka na 517 nm

A_0 – apsorbancija slijepe probe na 517 nm

3.3.1.7.2. ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] metoda

ABTS određivanje sposobnosti vezanja slobodnih radikala je provedeno prema metodi koju su objavili Shirwaikar i sur. (2006). Kationska otopina ABTS reagensa je pripravljena miješanjem 1 mL 100 mM kalijevog bikromata i 25 mL 10 mM ABTS. Ovako pripravljena otopina je držana preko noći na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. 500 μ L ABTS kationske otopine radikala je dodano u 2 mL ekstrakata različitih koncentracija. Te su reakcijske smjese ostavljene bez miješanja 15 minuta, nakon čega je uzorcima mjerena apsorbancija pri 734 nm. Kao referentni standard je uporabljena otopina BHT različitih koncentracija (0,2-1,0 mg/mL).

3.3.1.7.3. FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda

Sposobnost ekstrakata za redukcijom željeznih iona određivana je mjerenjem plavo obojenog Fe(II)-triazina koji nastaje iz oksidiranog Fe(III) djelovanjem elektron donirajućih antioksidanata (Benzie i Strain, 1996). FRAP reagens je pripremljen s 2,5 mL 10 mM TPTZ-a i 2,5 mL 20 mM FeCl₃ u 25 mL 0,3 M acetatnog pufera. 1 mL ekstrakata je pomiješano s

500 mL FRAP reagensa i inkubirano 30 minuta pri 37 °C. Apsorbancija uzoraka je mjerena pri 595 nm, a BHT (5-30 µg/mL) je korišten kao referentni standard.

3.3.1.8. Sposobnost keliranja željeznih iona

Kelirajuća sposobnost određivana je prema metodi Dinisa i sur. (1994). Ekstrakti (0,1 – 30 mg/mL) su pomiješani s 3,7 mL metanola i 0,1 mL 2 mM željeznog klorida. Reakcija je pokrenuta dodatkom 0,2 mL 5 mM ferozina. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (10 minuta), izmjerena je apsorbancija na 562 nm. Kao standardni reagensi uporabljeni su limunska kiselina i EDTA.

3.3.1.9. Određivanje reducirajuće snage

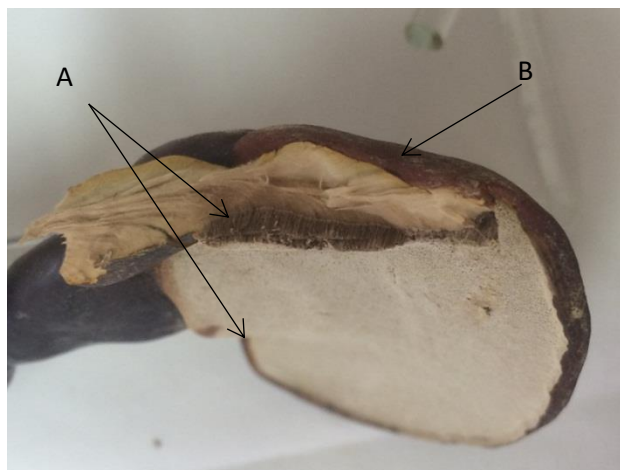
Reducirajuća snaga je određivana prema metodi Oyaizu (1986). Svaki od ekstrakata (0,1 – 30 mg/mL) je pomiješan s 2,5 mL 200 mM fosfatnog pufera (pH 6,6) i 2,5 mL kalijevog ferocijanida (10 mg/mL), te inkubiran pri 50 °C tijekom 20 minuta. Nakon toga je u uzorke dodano 2,5 mL trikloroctene kiseline (100 mg/mL) te su centrifugirani pri 200 okretaja/10 minuta. Gornji sloj (5 mL) je pomiješan s 5 mL deionizirane vode i 1 mL željeznog klorida (1 mg/mL), te je izmjerena apsorbancija na 700 nm. Veća vrijednost apsorbancije ukazala je na veću reducirajuću snagu. EC₅₀ vrijednosti (mg ekstrakta/mL) su koncentracije ekstrakta pri kojima je apsorbancija iznosila ½ vrijednosti apsorbancije izmjerene za reducirajuću snagu i dobivene su interpolacijom. Kao standardi su uporabljeni askorbinska kiselina i α-tokoferol.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Moderna medicina svjedoči promjeni paradigme o tome da biljni izvori mogu biti alternativa sintetičkim lijekovima. Biljke sadrže bezbroj aktivnih metabolita (alkaloide, flavonoide, fenolne kiseline, terpenoide, ugljikohidrate i estere) koji imaju brojne farmakološke i terapijske učinke (Abdallah, 2011). Carstvo viših gljiva koje se sastoji od brojnih i raznolikih vrsta koje obiluju primarnim i sekundarnim bioaktivnim metabolitima pojedinačno ili u simbiozi s drugim organizmima, dokazano promoviraju ljudsko zdravlje zahvaljujući raznim farmakološkim učincima. Medicinska gljiva *G. lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (*Reishi*, *Lin Tzi*) jedna je od najvažnijih polipornih gljiva, čuvenih po svojim medicinskim svojstvima. Ova orijentalna gljiva se u Kini i drugim azijskim zemljama smatra promotorom zdravlja i dugovječnosti (Shiao i sur., 1994). Plodište gljive, kao i uzgojeni micelij *G. lucidum* (Slike 3 i 5) pokazali su se učinkovitima u liječenju hepatopatije, hipertenzije, hiperglikemije i neoplazije (Hsu i sur., 2008). Pronađeno je da plodišta, micelij i ekstrakti dobiveni iz 650 vrsta i 7 nespecifičnih vrsta iz 182 rodova viših hetero- i homobazidiomiceta sadrže farmakološki aktivne polisaharide, pri čemu je najveća koncentracija polisaharida izolirana iz plodišta medicinskih gljiva (Wasser, 2010). Također je dokazano da koncentracija polisaharida varira ovisno o stadiju razvijenosti plodišta, kao i o uvjetima skladištenja (Minato i sur., 1999; Minato i sur., 2001).

Viši bazidiomiceti su bogat izvor biološki aktivnih antitumornih i antioksidacijskih polisaharida (Wasser, 2014), pri čemu fenoli, triterpeni i polisaharidi iz *G. lucidum* imaju važnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa, no dokazano je da je i u nekim jestivim gljivama koncentracija ukupnih fenola izravno povezana s antioksidacijskom aktivnošću, te da fenoli sudjeluju u stabilizaciji lipidnih peroksida (Yen i sur., 1993; Halliwell, 1996; Barros i sur., 2007).

Reishi gljiva (*G. lucidum*) je u Hrvatskoj poznata pod nazivom Hrastova sjajnica. Ova gljiva pripada stapčarkama iz koljena *Basidiomycetes* i porodice *Ganodermataceae* (Bibi i sur. 2009). Prepoznatljiva je po plosnatom, kožastom i tvrdom klobuku te sjajnoj crvenoj površini, kao i po visokoj morfološkoj plastičnosti koja varira ovisno o stadiju zrelosti bazidiokarpa. Donja strana klobuka je prekrivena porama kroz koje se otpuštaju spore, a ovisno o starosti gljive, može biti od bijele do smeđe boje (Slika 6).



Slika 6. Prikaz slojevitosti plodišta istraživane crvene *G. lucidum*. A) dvostruki sloj plodišta; B) crvena površina klobuka (fotografirala Veronika Radišić)

4.1. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SASTOJAKA

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka provedena je s dva ekstrakcijska sredstva; vrućom vodom i metanolom, s ciljem dobivanja ekstrakata koji sadrže spojeve velike molekulske mase, kao što su polisaharidi i male molekulske mase, koji su većinom fenolni spojevi. Obje vrste spojeva imaju važnu ulogu u medicinskom statusu gljiva (Ferreira i sur., 2010). Prinos ekstrakata iz plodišta i micelija gljive *G. lucidum* prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Prinos vodenih i metanolnih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

Stadij	Prinos ekstrakta (g /100 g s.tv.)	
	voda	metanol
plodište	41,15	15,27
micelij	12,12	5,31

Poznato je da su voće i povrće su bogati izvori antioksidanasa, kao što su vitamini A, C i E, karotenoidi, polifenolne supstancije i flavanoidi, koji štite od oštećenja slobodnim radikalima, te smanjuju rizik od kroničnih bolesti. U ovom radu jedan od ciljeva bio je ispitati antioksidacijska svojstva micelija i plodišta gljive *G. lucidum*, odnosno odrediti udjel

askorbinske kiseline, β -karotena, α -tokoferola i ukupnih fenola, a rezultati su prikazani u Tablici 5.

Poznato je da fenolne supstancije u velikoj mjeri doprinose antioksidacijskoj snazi određene namirnice. Ovim istraživanjima je potvrđeno da su ukupni fenoli bili dvostruko više zastupljeni u plodištu, nego u miceliju. Također se metanol kao ekstrakcijsko sredstvo pokazao učinkovitijim nego vruća voda, a dobiveni su rezultati ukazali da su ukupni fenoli glavni antioksidansi u gljivi *G. lucidum* (Tablica 5). Ovi se rezultati u potpunosti slažu s rezultatima koje su objavili Rawat i sur. (2013), koji su također potvrdili da je koncentracija fenolnih spojeva u *G. lucidum* veća u metanolnim ekstraktima nego u vodenim. Goli i sur. (2005) su došli do istog zaključka da koncentracija fenolnih spojeva u ekstraktu ovisi o tipu otapala koje se upotrebljava za ekstrakciju. No, nisu samo fenolni spojevi odgovorni za antioksidacijska svojstva, i ostale fitokemikalije mogu doprinjeti ukupnom učinku (Saltarelli i sur., 2009). *G. lucidum* je izrazito bogata triterpenima i polisaharidima koji su glavni fiziološki sastojci koji povećavaju antioksidacijski kapacitet (Shiao i sur., 1994; Tseng i sur., 2008).

Tablica 5. Maseni udjel askorbinske kiseline ($\mu\text{g/g}$ s. tv.), β -karotena, α -tokoferola i ukupnih fenola (mg/g s. tv.) u ekstraktima gljiva (vruća voda i metanol)

Vrsta gljiva	Maseni udjel (mg/g s.tv.)			
	Voda			
	Askorbinska kiselina	β -karoten	α -tokoferol	Ukupni fenoli
plodište	171,23	no ^a	no ^a	32,86
micelij	139,55	no ^a	no ^a	14,91
	Metanol			
plodište	176,35	4,09	1,24	39,55
micelij	155,11	0,06	1,61	18,89

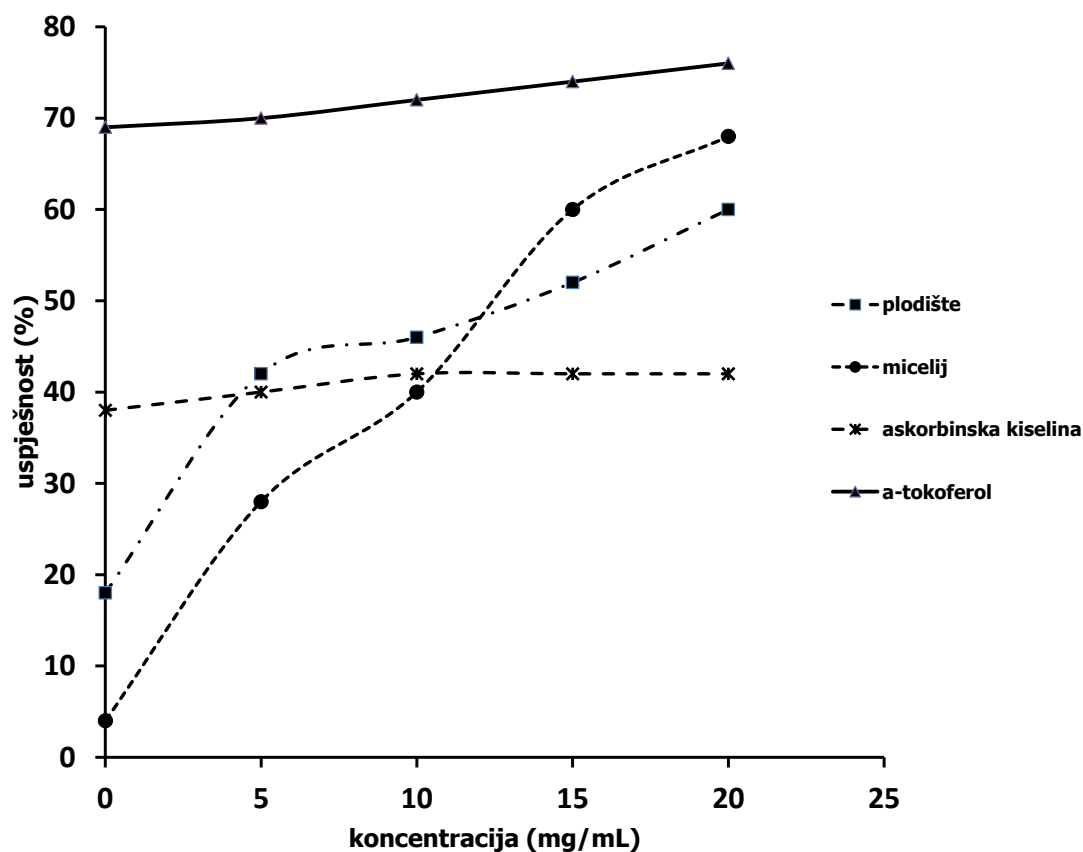
no^a = nije određeno

Medicinske gljive svojim fitofarmaceutskim svojstvima i teksturom predstavljaju važan izvor biološki aktivnih sastojaka koji imaju terapijsku vrijednost. Za gljive se općenito može reći da su niskoenergetske namirnice vrlo bogate vlaknima (Yim i sur., 2009), te izvanredan izvor

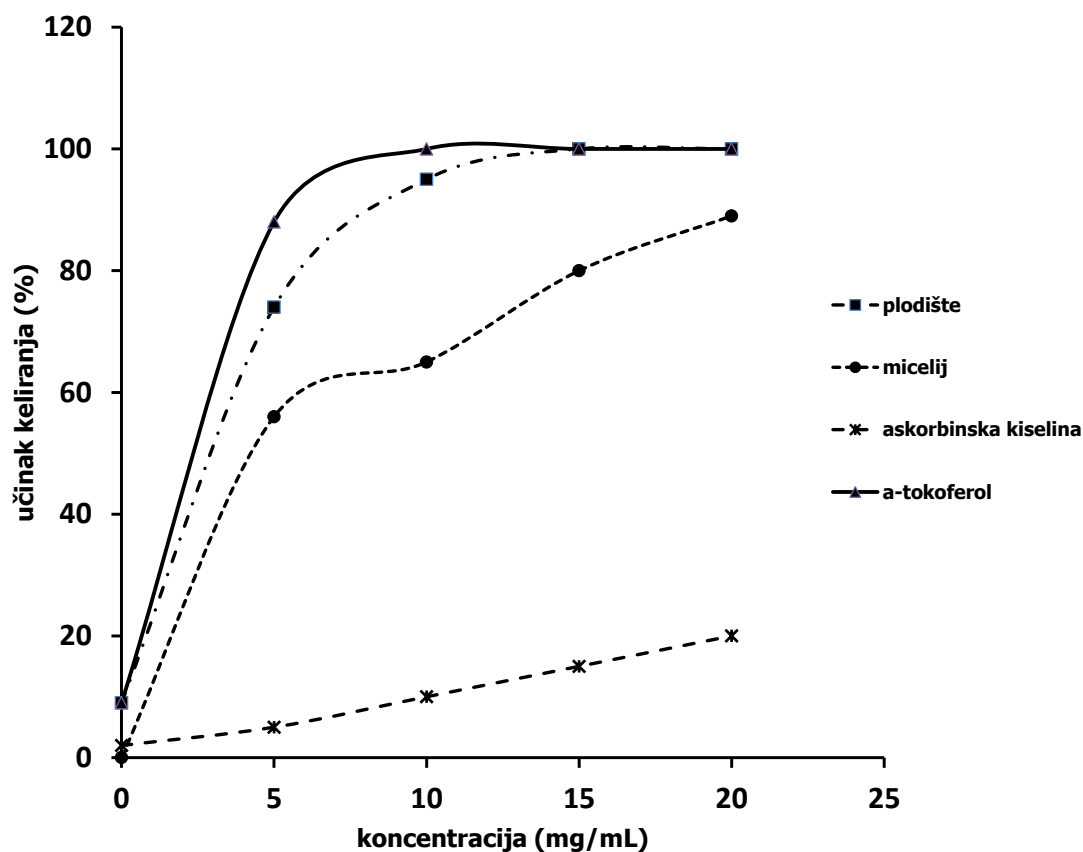
antioksidansa budući da nakupljaju različite sekundarne metabolite, uključujući i fenolne sastojke (Cheung i sur., 2003).

Antioksidacijska aktivnost prirodnih sastojaka se u posljednje vrijeme pojačano proučava zahvaljujući potražnji farmaceutskih i prehrambenih industrija, koje pokazuju sve veći interes za prirodne bioaktivne sastojke kojima se poboljšava ljudsko zdravlje (Smith i sur., 2002). Fenolni spojevi su glavni antioksidacijski sastojci kojima gljive obiluju, za razliku od drugih jakih antioksidansa (askorbinska kiselina, β -karoten, likopen i α -tokoferol) koji su u gljivama zastupljeni u relativno malim količinama (Yang i sur., 2002; Barros i sur., 2008).

Sposobnost vezanja slobodnih radikala, kao i antioksidacijska svojstva gljiva su u posljednje vrijeme predmet brojnih istraživanja, koja sugeriraju moguću pozitivnu ulogu tih sastojaka, budući da mogu vezati metale, inhibirati aktivnost lipoksigenaze i vezati slobodne radikale (Slike 7-9).



Slika 7. Sposobnost vezanja slobodnih radikala vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*



Slika 8. Spособnost keliranja željeza vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

Plodište i micelij gljive *G. lucidum* su pokazali zadovoljavajuću antioksidacijsku aktivnost (Slike 7-9), pri čemu je micelij imao veće EC_{50} vrijednosti (od 0,42 do 11,98) u vodenim ekstraktima (Tablica 6).

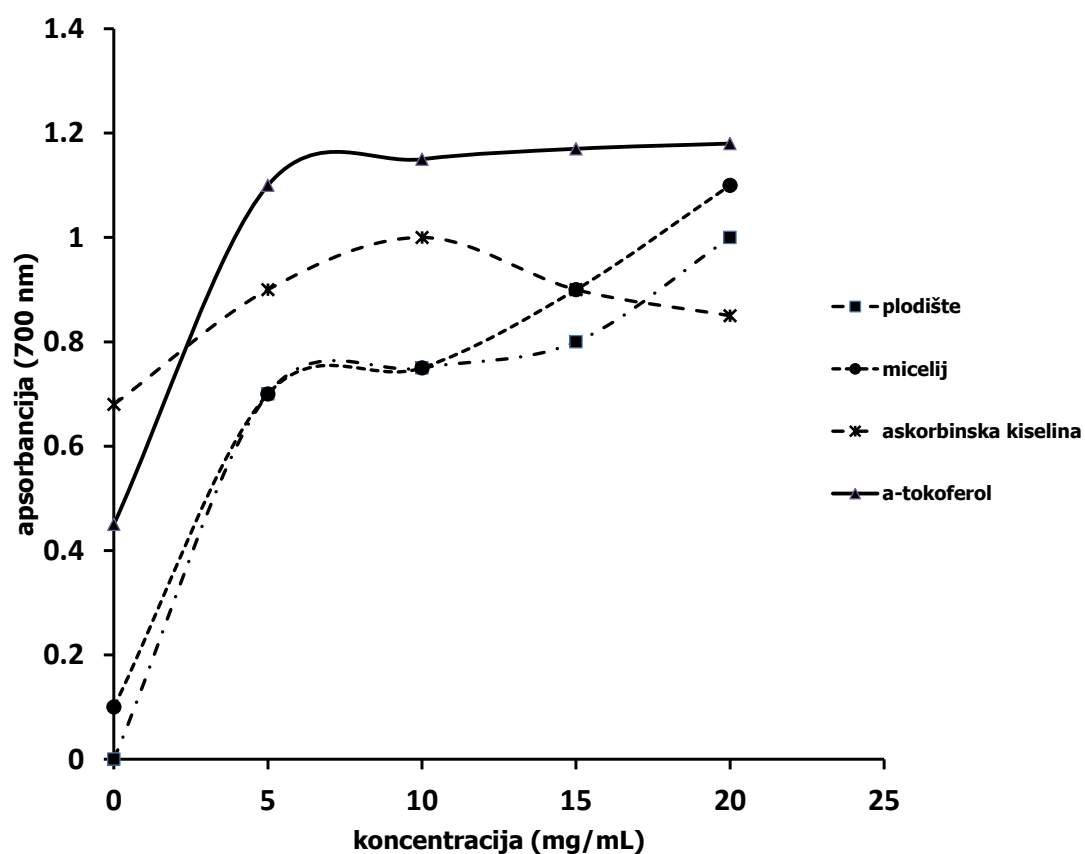
Tablica 6. EC_{50} vrijednost vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

Ekstrakt <i>G. lucidum</i>	EC_{50} vrijednosti vodenih ekstrakata	
	plodište	micelij
antioksidacijska aktivnost	<0,1	0,42
reducirajuća snaga	0,92	3,99
sposobnost vezanja DPPH radikala	11,23	11,98
sposobnost vezanja iona željeza	0,73	4,66

Istraživanja su pokazala da su vodeni ekstrakti micelija i plodišta pokazali vrlo visoku reducirajuću snagu (Tablica 7, Slika 9).

Tablica 7. Usporedni prikaz reducirajuće snage istraživanih vrsta gljiva

Stadij	Ukupna reducirajuća snaga (mg GK/g s. tv.)	
	voda	metanol
plodište	10,01	9,68
micelij	10,21	10,06

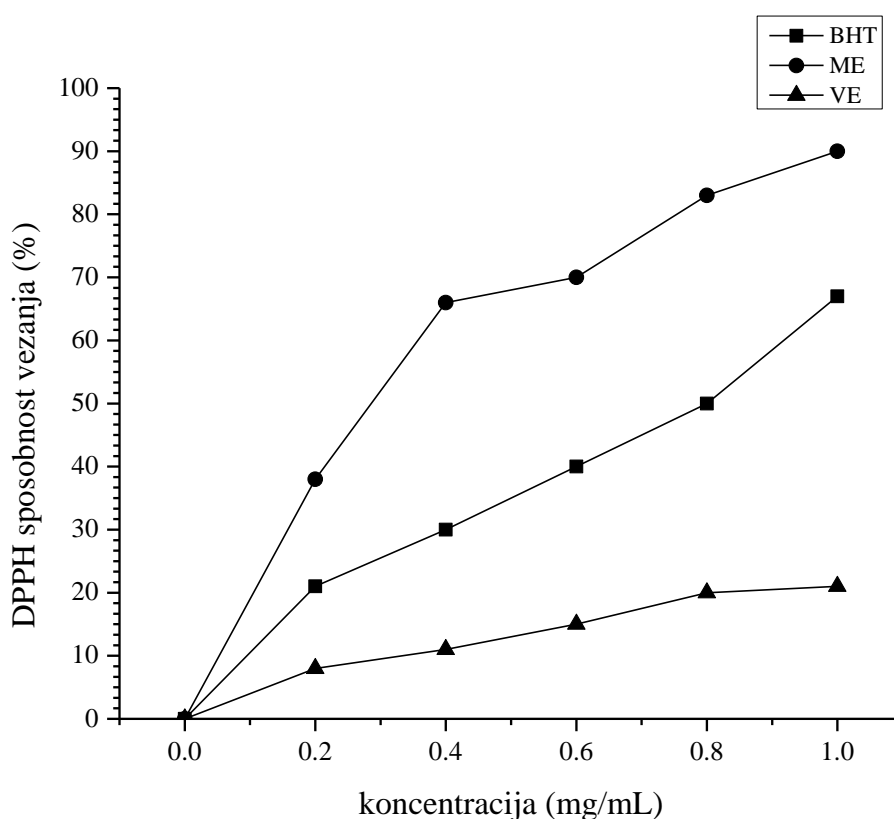


Slika 9. Reducirajuća snaga vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

4.2. SPOSOBNOSTI VEZANJA SLOBODNIH RADIKALA

4.2.1. DPPH i ABTS određivanja

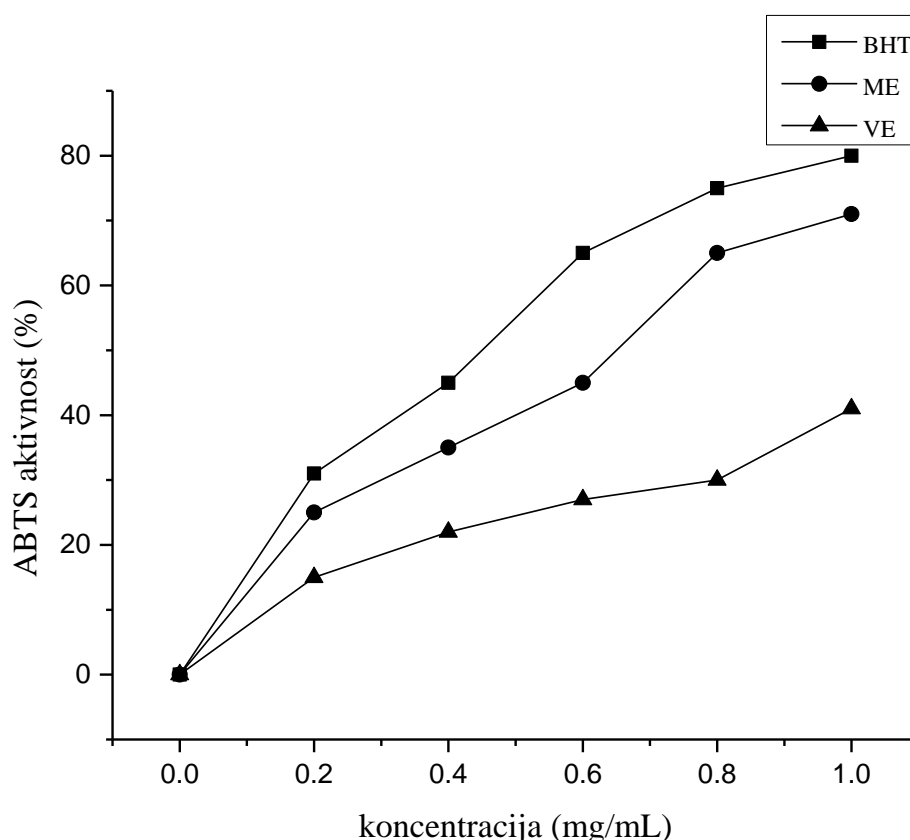
U ovom radu je metanolni ekstrakt plodišta gljive *G. lucidum* pokazao bolju DPPH sposobnost vezanja slobodnih radikala ($EC_{50} = 0,29$ mg/mL) u usporedbi s vodenim ekstraktom ($EC_{50} = 2,389$ mg/mL) (Slika 10). Dobiveni rezultati se mogu objasniti povećanom količinom fenolnih i triterpenskih sastojaka u metanolnom ekstraktu. Slične rezultate objavili su i Saltarelli i sur. (2009).



Slika 10. Rezultati istraživanja antioksidacijskog kapaciteta vodenih i metanolnih ekstrakata plodišta *G. lucidum* metodom DPPH vezanja slobodnih radikala (ME; metanolni ekstrakti, VE; vodeni ekstrakti; BHT; standardna otopina)

Primjenom ABTS metode, istraživano je izravno nakupljanje radikal monokationa ($ABTS^+$), bez utjecaja bilo kakvih drugih intermedijarnih radikala. Ti radikal monokationi se nakupljaju prije dodatka antioksidacijskog testnog sustava, a ne kontinuirano u prisutnosti antioksidansa,

a ta se sposobnost vezanja radikala u ekstraktima procjenjuje praćenjem obezbojenja reakcijske smjese. Ova se metoda uobičajeno koristi za mjerene koncentracija i lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa. Na Slici 11 je vidljivo da je aktivnost ABTS vezanja metanolnog ekstrakta ($EC_{50} = 0,58 \text{ mg/mL}$) veća nego u vodenom ($EC_{50} = 1,419 \text{ mg/mL}$). Smanjena sposobnost vezanja slobodnih radikala u vodenom ekstraktu mogla bi biti rezultat promjena koncentracija fenolnih i triterpenskih antioksidansa kao rezultat prirode polarnih otapala (Pedrielle i sur., 2001).

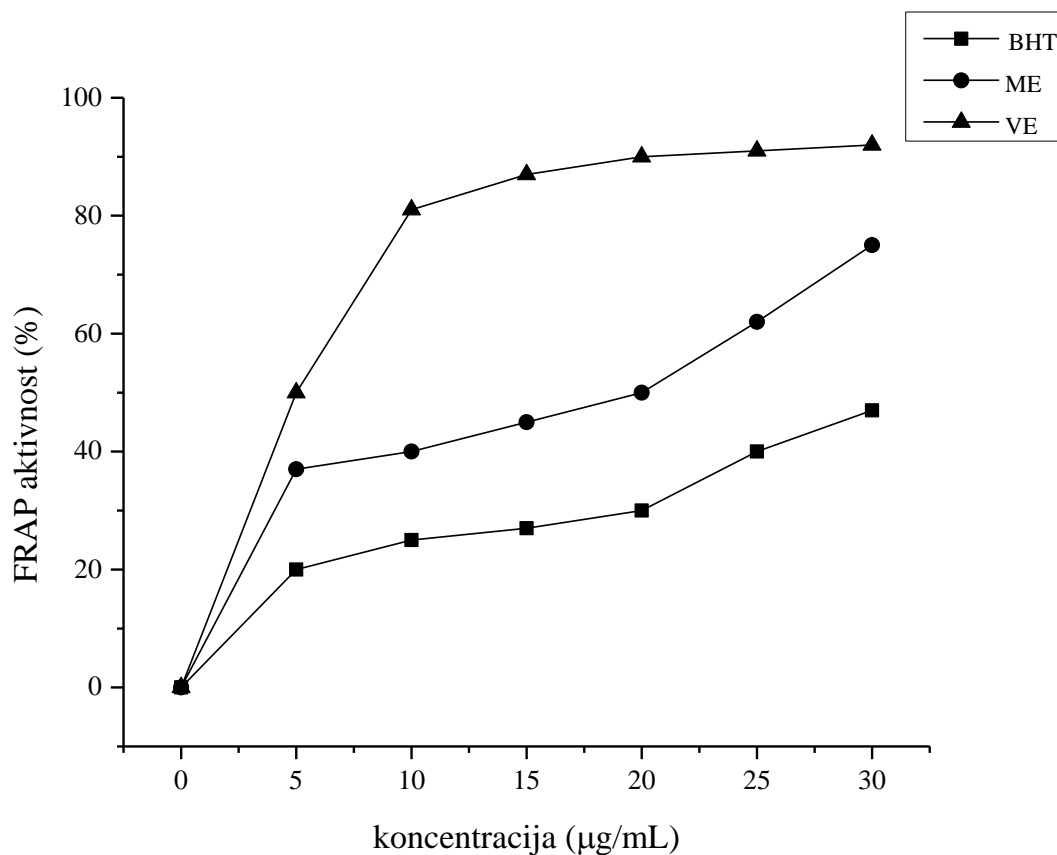


Slika 11. Rezultati istraživanja antioksidacijskog kapaciteta vodenih i metanolnih ekstrakata *G. lucidum* metodom ABTS nastajanja radikal monokationa (ME; metanolni ekstrakti, VE; vodeni ekstrakti; BHT; standardna otopina)

4.2.2. FRAP određivanje

Sposobnost redukcije aktivnosti željeznih iona vodenih i metanolnih ekstrakata gljive *G. lucidum* je također određivano (Slika 12). Vodeni ekstrakt je pokazao bolju sposobnost vezanja

($EC_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$), nego metanolni ekstrakt ($EC_{50} = 16,8 \mu\text{g/mL}$). Aktivnost FRAP vezanja u vodenom ekstraktu može se objasniti polisaharidima prisutnim u ekstraktu.



Slika 12. Rezultati istraživanja antioksidacijskog kapaciteta vodenih i metanolnih ekstrakata *G. lucidum* metodom FRAP redukcije željeznih iona (ME; metanolni ekstrakti, VE; vodeni ekstrakti; BHT; standardna otopina)

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Biološki aktivne supstancije iz plodišta i micelija gljive *G. lucidum* ekstrahirane su s dva ekstrakcijska sredstva: vrućom vodom (95 °C) i metanolom (37 °C). Bolji prinos ekstrakta postignut je ekstrakcijom plodišta s vrućom vodom (41,15 g/100 g s.tv.) i micelija (12,12 g/100 g s. tv.), dok je s metanolom postignut prinos od 5,31 g/100 g s. tv. (plodište) i 5,21 g/100 g s.tv. (micelij).
2. Vodeni i metanolni ekstrakti plodišta i micelija gljive *G. lucidum* su vrlo bogati fenolnim spojevima, čiji su se maseni udjeli bili između 32,86 i 39,55 mg/g s. tv. (plodište), te 14,91 i 18,99 mg/g s. tv. (micelij).
3. Udjeli askorbinske kiseline su bili vrlo visoki i u metanolnom i u vodenom ekstraktu (171,23 i 139,55 mg/g s.tv.). U vodenom ekstraktu nisu određeni udjeli β -karotena i α -tokoferola, dok su u metanolnom ekstraktu određeni u plodištu 4,09 mg/g s.tv., a u miceliju 0,06 mg/g s.tv.
4. Ekstrakti plodišta gljive *G. lucidum* pokazali su jaki antioksidacijski kapacitet i sposobnost vezanja slobodnih radikala, što je dokazano svim primijenjenim metodama istraživanja.
5. Rezultati su ukazali na pozitivnu korelaciju između udjela fenolnih supstancija i antioksidacijskog kapaciteta.

6. LITERATURA

Abdallah, E. M. (2011) Plants: an alternative source for antimicrobials. *J. Appl. Pharm. Sci.* **1**(6), 16–20.

Ali, N., Muhammad, A., Akbar, S. A. (2016) Anxiolytic-like activity of ethanol extract of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in mice. *Health Sci.* **5**(6), 57-60.

Babitskaya, V. G., Bisko, N. A., Scherba, V. V., Mitropolskaya, N. Y. (2003) Some biologically active substances from medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Med. Mushrooms* **5**, 301-307.

Barros, L., Ferreira, M. J., Queiros, B., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P. (2007) Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.* **103**, 413–419.

Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. E., Ferreira, I. C. F. R. (2008) Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2742-2747.

Benzie, I. E.F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **23**, 70–76.

Bibi, I., Bhatti, H. N., Asgher, M. (2009) Decolourisation of Direct Dyes With Manganese Peroxidase From White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*-IBL-5. *Canad J. Chem. Eng.* **87**, 435-440.

Bishop, K. S., Kao, C. H., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M., Ferguson, L. R. (2015) From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry* **114**, 56-65.

Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., Zhi-Bin, L. (2007) *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol. Ann. Rev.* **13**, 265-301.

Calder, P. C. (2003) Immunonutrition. *Br. Med. J.* **327**, 117-125.

Carlson, J. (1996) Reishi Mushroom, New Editions Health World, str. 23-25.

Chang, S. T., Buswell, J. A. (2003) Medicinal Mushrooms: a prominent source of nutraceuticals for the 21st century. *Curr. Topics Nutraceut. Res.* **1(3)**, 257-280.

Chang, C. J., Lin, C. S., Lu, C. C., Martel, J., Ko, Y. F., Ojcius D. M., Tseng, S. F., Wu, T. R., Chen, Y. Y., Young, J. D., Lai, H. C. (2017) Corrigendum: *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nature Commun.* **8**, 16130-16157.

Chen, X. P., Chen, Y., Li, S. B., Chen, Y. G., Lan, J. Y., Liu, L. P. (2009) Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats. *Carbohydr. Polym.* **77**, 389–393.

Chen, C., Li, P., Li, Y., Yao, G., Xu, J. H. (2016) Antitumor effects and mechanisms of *Ganoderma* extracts and spores oil. *Oncology lett.* **12(5)**, 3571-3578.

Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. (2003) Antioxidant activity and total phenolic of edible mushroom extracts. *Food Chem.* **81**, 249-255.

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, M. L. M. (1994) Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 161-169.

Duh, P. D., Tu, Y. Y., Yen, G. C. (1999) Antioxidant activity of water extract of harnjyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT-Food Technol.* **32**, 269–277.

Feldhammer, M., Uetani, N., Miranda-Saavedra, D., Tremblay, M. L. (2013) PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit. Reviews Biochem. Mol. Biol.* **48(5)**, 430-445.

Ferreira, I. C. F. R., Vaz, J. A., Vasconcelos, M. H., Martins, A. (2010) Compounds from wild mushrooms with antitumor potential, 5. izd., Bentham Science Publishers., str. 424-436.

Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J., Zhou, S. (2004) A phase I/II study of ling zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.,Fr.) Lloyd (*Aphyllophoromycetidae*) extract in patients with type II diabetes mellitus. *Int. J. Med. Mushrooms* **6**, 33-39.

Gao, Y., Zhou, S., Chen, G., Dai, X., Ye, J., Gao, H. (2002) A Phase I/II Study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) extract in patients with chronic hepatitis B. *Int. J. Med. Mushrooms* **4(4)**, 281-288.

Gao, Y., Zhou, S. H., Huang, M., Xu, A. (2003) Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (*Aphyllophoromycetideae*): a review. *Int. J. Med. Mushrooms* **5(3)**, 235-246.

Gao, J. L., Leung, K. S., Wang, Y. T., Lai, C. M., Li, S. P., Hu, L. F.(2007) Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC-DAD-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44(3)**, 801-811.

Goli, A. H., Barzegar, M., Sahari, M. A. (2005) Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem.* **92**, 521-525.

Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 33–50.

Heleno, S. A., Ferreira, I. C. F. R., Esteves, A. P., Ciric, A., Glamoclija, J., Martins, A. i sur. (2013) Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food Chem. Toxicol.* **58**, 95-100.

Hobbs, C. (1995) Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Culture, 2.izd., Botanica Press, Santa Cruz.

Hsu, S. C., Ou, C. C., Li, J. W., Chuang, T. C., Kuo, H. P., Liu, J. Y., Chen, C. S., Lin, S. C., Su, C. H., Kao, M. C. (2008) Ganoderma tsugae extracts T inhibit colorectal cancer cell growth via G(2)/M cell cycle arrest. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 394–401.

Jagota S., Dani H. (1982) A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Anal. Biochem.* **127**(1), 178-182.

Jin, H., Zhang, G., Cao, X., Zhang, M., Long, J., Luo, B. i sur. (1996) Treatment of hypertension by Linzhi combined with hypotensor and its effects on arterial, arteriolar and capillary pressure microcirculation. Microcirculatory Approach to Asian Traditional Medicine: Strategy for the Scientific Evaluation. Excerpta Medica, International Congress Series Elsevier, Amsterdam/New York, str. 131-138.

Kao, C. H. J., Jesuthasan, A. C., Bishop, K. S., Glucina, M. P., Ferguson, L. R. (2013) Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *Funct. Foods Health Dis.* **3**(2), 48-65.

Lin, C. N., Fann, Y. F., Cheung, M. I. (1997) Steroids of formosan *Ganoderma tsugae*. *Phytochem.* **46**, 1143-1146.

Liu, J., Shimizu, K., Konishi, F., Noda, K., Kumamoto, S., Kurashiki, K. (2007) Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chem.* **100**, 1691-1696.

Liu, J., Shimizu, K., Tanaka, A., Shinobu, W., Ohnuki, K., Nakamura, T. (2012) Target proteins of ganoderic acid DM provides clues to various pharmacological mechanisms. *Sci. Rep.* **2**, 905-909.

Liu, J., Shiono, J., Shimizu, K., Kukita, A., Kukita, T., Kondo, R. (2009) Ganoderic acid DM: anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2154-2157.

Ma, L., Wu, F., Chen, R. Y. (2003) Analysis of triterpene constituents from *Ganoderma lucidum*. *Acta Pharm. Sin.* **38**, 50-52.

Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J. Univ. Chem. Technol. Metallurgy* **40**, 255–260.

Matsomoto, K. (1979) *The Mysterious Reishi Mushroom*, Woodbridge Press Publishing Company, Santa Barbara.

Minato, K., Mizuno, M., Ashida, H., Hashimoto, T., Terai, H., Tsuchida, H. (1999) Influence of storage conditions on immunomodulating activity of *Lentinus edodes*. *Int. J. Med. Mushrooms* **1**, 243–250.

Minato, K., Mizuno, M., Kawakami, S., Tatsuoka, S., Denpo, Y., Tokimato, K. Tsuchida, H. (2001) Changes in immunomodulating activities and content of antitumour polysaccharides during growth of two mushrooms, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing and *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. *Int. J. Med. Mushrooms* **3**, 1–7.

Moncalvo, J. M., Ryvarden, L. (1997) A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk, Fungiflora, Oslo.

Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude G. A. (2007) Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int. Immunopharmacol.* **7(6)**, 701-724.

Muhammad, A., Ali, N. (2017) Antidepressant-like activity of ethanol extract of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in mice. *Health Sci.* **6(5)**, 55-58.

Nie, Y., Zhao, S., Zhao, G., Hou, Y. (2010) *Ganoderma lucidum* spores oil-induced anti-tumor effect and immunological function change in tumorbearing mice. *Immunol. J.* **26(12)**, 1052-1055.

Ooi, V. E. C, Liu, F. (2000) Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr. Med. Chem.* **7(7)**, 715-729.

- Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reactions. Antioxidative activities of products of browning reactions prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutrit. Dietetics*, **15**, 307-315.
- Paydary, K., Khaghani, P., Emamzadeh-Fard, S., Alinaghi, S. A., Baesi, K. (2013) The emergence of drug resistant HIV variants and novel anti-retroviral therapy. *Asian Pacif. J. Tropical Biomed.* **3**(7), 515-522.
- Pedrielle, P., Pedulli, G. F., Skibsted, L. H. (2001) Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain breaking reaction of quercetin and epicatechin in autooxidation of methyl linolenate. *J. Agric. Food Chem.* **4**, 3034-3040.
- Pillai, T. G., Nair, C. K., Janardhanan, K. K. (2008) Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both *in vitro* and *in vivo*. *Environment. Toxicol. Pharmacol.* **26**, 80-85.
- Qu, H. G., Gao, L., He, D., Liu, C., Yan, W., Gao, S. (2011) Effect of reversion of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cisplatin resistant in ovarian cancer cells and its mechanism. *J. Jilin. Univ.* **37**(2), 250-254.
- Rathee, D., Rathee, P., Rathee, S., Rathee, D. (2012) Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Picrorrhiza kurroa*, an Indian traditional plant used to treat chronic diarrhea. *Arab. J. Chem.* **24**, 11-19.
- Rawat, A., Mohsin, N., Negi, P. S., Sah, A. N., Singh, S. (2013) Evaluation of polyphenolic contents and antioxidant activity of wild collected *Ganoderma lucidum* from central Himalayan hills of India. *Asia J. Plant Sci. Res.* **3**, 85-90.
- Richter, C., Wittstein, K., Kirk, P. M., Stadler, M. (2015) An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Div.* **71**(1), 1-5.
- Russel, R., Paterson, M. (2006) *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochem.* **67**, 1985-2001.

Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Lotti, M., Zambonelli, A., Buffalini, M., Casadei, L., Vallorani, L., Stocchi, V. (2009) Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from central Italy. *Food Chem.* **116**, 143–151.

Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B. K. S., Bisen, P. S. (2009) *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**(8), 717-742.

Seow, S. L. S., Naidu, M., David, P., Wong, K. H., Sabaratnam, V. (2013) Potentiation of neurotogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells. *BMC Complement. Alt. Med.* **13**(1), 157-161.

Seto, S., Lam, T., Tam, H., Au, A., Chan, S., Wu, J., Yu, P., Leung, G., Ngai, S., Yeung, J. (2009) Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extract in obese/diabetic (+ db/+ db) mice. *Phytomedicine* **16**(5), 426-436.

Shah, P., Modi, H. A., Shukla, M. D., Lahiri, S. K. (2014) Preliminary phytochemical analysis and antibacterial activity of *Ganoderma lucidum* collected from Dang District of Gujarat, India. *Int. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **3**(3), 246-255.

Shiao, M. S., Lee, K. R., Lin, L. J., Wang, C. T. (1994) Natural-products and biological activities of the Chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Food Phytochem. Cancer Prevent.* **547**, 342–354.

Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punithaa, I. S. R. (2006) *In vitro* antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1906-1911.

Skalicka-Woźniak, K., Szypowski, J., Łoś, R., Siwulski, M., Sobieralski, K., Głowniak, K. (2012) Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Soc. Bot. Pol.* **81**(1), 17-21.

Smina, T., Mathew, J., Janardhanan, K., Devasagayam, T. (2011) Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **32(3)**, 438-446.

Song, B. J., Zhu, X. J., Wei, L. N. (2010) Effect of *Ganoderma lucidum* spores on immune modulation and inhibiting tumor in mice. *J. Harbin. Med. Univ.* **44(5)**, 464-466.

Stamens, P. (2000) Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3.izd., Ten Speed Press, New York.

Suay, I., Arenal, F., Asensio, F. J., Basilio, A., Cabello, M. A., Diez, M. T. (2000) Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities. *An Van Leeuw J. Microb.* **78**, 129-139.

Tang, W., Gao, Y., Chen, G., Gao, H., Dai, X., Ye, J., Chan, E., Huang, M., Zhou, S. (2005) A randomized, double-blind and placebo-controlled study of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract in neurasthenia. *J. Med. Food* **8(1)**, 53-58.

Tang, Y. J., Zhu, L. W., Li, H. M., Li, D. S. (2007) Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors-Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 221-229.

Tseng, Y. H., Mau, J. L. (2007) Antioxidant properties of cold water extracts from *Ganoderma tsugae*. *Fungal Sci.* **22(1,2)**, 13-23.

Tseng, Y. H., Yang, J. H., Mau, J. L. (2008) Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.* **107**, 732-738.

Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J. A., Benzie, I. F. (2011) *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. U: Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects, 2. izd., (Benzie, I. F., Wachtel-Galor, S., ured.), CRC Press, Boca Raton.

Wachtel-Galor, S., Szeto, Y., Tomlinson, B., Benzie, I. F. (2004) *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **55**(1), 75-83.

Wang, M. Y., Liu, Q., Che, Q. M., Lin, Z. B. (2002) Effects of total triterpenoids extract from *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Reishi mushroom) on experimental liver injury models induced by carbon tetrachloride or d-galactosamine in mice. *Int. J. Med. Mushrooms* **4**, 337-342.

Wang, H., Ng, T. B. (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and its effect on hepatic damage caused by benzo(a)pyrene. *J. Ethnopharmacol.* **107**, 297-303.

Wasser, S. P. (2005) Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). U: Encyclopedia of Dietary Supplements, (Coates, P. M., Blackman, M. R., Cragg, G. M., Levine, M., Moss, J., White, J. D., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 603-622.

Wasser, S. P. (2010) Medicinal mushroom science, history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int. J. Med. Mush.* **12**(1), 1-16.

Wasser, S. P. (2011) Current finding, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1323-1332.

Wasser, S. P. (2014) Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences and challenges. *Biomed. J.* **37**(6), 345–356.

Wasser, S. P., Weis, A.L. (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev. Immunol.* **19**(1), 65-96.

Wiater, A., Paduch, R., Choma, A., Pleszczyńska, M., Siwulski, M., Dominik, J. (2012) Biological study on carboxymethylated (1→3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromolecules* **51**(5), 1014-1023.

Xu, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., Wang, Y. (2011) *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *Am J. Chinese Med.* **39**(1), 15-27.

Yamin, S., Shuhaimi, M., Arbakariya, A., Fatimah, A. B., Khalilah, A. K., Anas, O. i sur. (2012) Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the growth of *Bifidobacterium* spp. as assessed using real-time PCR. *Int. Food Res.* **19**(3), 1199-1205.

Yang, J. H., Lin, H. C., Mau, J. L. (2002) Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.* **77**, 229-235.

Yen, G. C., Duh, P. D., Tsai, C.L. (1993) Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 67–70.

Yim, H. S., Chye, F. Y., Ho, S. K., Ho, C. W. (2009) Phenolic profiles of selected edible mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *Asian J. Food Agro-Ind.* **2**, 392-401.

Yoon, S. Y., Eo, S. K., Kim, Y. S. (1994) Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Arch. Pharm. Res.* **17**(6), 438-442.

Yuan, J. F., Zhang, Z. Q., Fan, Z. C., Yang, J. X. (2008) Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Carb. Polym.* **74**(4), 822-827.

Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., Wang, Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 4-19.

Zhang, Y., Huang, N., Zhang, X., Luo, J. (2011) Effect of *Ganoderma lucidum* triterpenoids on the learning and memory ability and brain glutamate levels in mice aging model. *J. Neurol. Neurorehabil.* **8**(1), 31-34.

Zhao, H., Zhang, Q., Zhao, L., Huang, X., Wang, J., Kang, X. (2012) Spore powder of *Ganoderma lucidum* improves cancer-related fatigue in breast cancer patients undergoing endocrine therapy: a pilot clinical trial. *Evid.-Based Compl. Alt.* 1-8.

Zheng, L., Si, J., Wong, Y. S. (2009) Ergosterol peroxide and 9,11-dehydroergosterol peroxide from Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae) mycelia inhibit the growth of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Int. J. Med. Mushrooms* **11(3)**, 249-257.

Zhong, D., Wang, H., Liu, M., Li, X., Huang, M., Zhou, H., Lin, S., Lin, Z., Yang, B. (2015) *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide prevents renal ischemia reperfusion injury via counteracting oxidative stress. *Scientific Reports* **5**, 232-238.

Zhong, L., Jiang, D. Z., Wang, Q. R. (1999) Effects of *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr) Karst compound on the proliferation and differentiation of K562 leukemic cells. *J. Hunan. Med. Univ.* **24**, 521-524.

Zhonghui, Z., Xiaowei, Z., Fang, F. (2014) *Ganoderma lucidum* polysaccharides supplementation attenuates exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle of mice. *Saudi. J. Biological Sci.* **21(2)**, 119-123.

Zhou, S., Gao, Y., Chen, G., Dai, X., Ye, J., Gao, H. (2002) A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.,Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) extract in patients with chronic hepatitis B. *Int. J. Med. Mushrooms* **4(4)**, 321-328.

Zhou, X., Lin J., Yin Y., Zhao J., Sun, X., Tang, K. (2007) Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *Am. J. Chin. Med.* **35(4)**, 559-574.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Veronika Radišić

Ime i prezime studenta